N° D'ENREGISTREMENT
AU C.N.R.S.
A.O. 9031

THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE DE PARIS VII

PAR

MONSIEUR JEAN-PIERRE BOUCHE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

oooOooo

SUJET DE LA THESE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA METHYLATION ENZYMATIQUE DE L'ADN CHEZ ESCHERICHIA COLI K.

SOUTENUE LE 20 OCTOBRE 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. M. GOLDBERG, PRÉSIDENT.

G. BUTTIN
J. M. DUBERT } EXAMINATEURS.
M. SCHWARTZ

N° D'ENREGISTREMENT
AU C.N.R.S.
A.O. 9031

THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITE DE PARIS VII

PAR

MONSIEUR JEAN-PIERRE BOUCHE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

oooOooo

SUJET DE LA THESE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA METHYLATION ENZYMATIQUE DE L'ADN CHEZ ESCHERICHIA COLI K.

SOUTENUE LE OCTOBRE 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. M. GOLDBERG, PRÉSIDENT.

G. BUTTIN
J. M. DUBERT } EXAMINATEURS.
M. SCHWARTZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PLAN DE LA THESE

INTRODUCTION.

LA METHYLATION GENERALE..... 1

LA METHYLATION MODIFICATRICE..... 6

RELATIONS ENTRE METHYLATION GENERALE ET SPECIFICITE D'HOTE 12

OBJET DU TRAVAIL..... 15

BIBLIOGRAPHIE..... 17

I - PURIFICATION DES ADN METHYL TRANSFERASES D'ESCHERICHIA COLI K_{12}..... 21

II - ETUDES DE PROPRIETES DES ADN METHYL TRANSFERASES D'ESCHERICHIA COLI K_{12}..... 34

Annexe : "*ADN méthylases d'Escherichia coli* K_{12} *: Mise en évidence de changements dans leur état d'association en cours de purification*".

Article en anglais, *Eur. J. Biochem.*, 27, 53, (1972).

III - "SYNTHESE D'ADN NON METHYLE CHEZ UN MUTANT dna B THERMOSENSIBLE D'ESCHERICHIA COLI CARENCE EN METHIONINE.

Article en anglais, *J. Bacteriol.*, 115, 752-761 (1973).....

IV - METHYLATION ET RESTRICTION IN VITRO D'UN ADN NON METHYLE ISOLE D'E. COLI K_{12}..... 59

RESUME..... 79

INTRODUCTION :

Depuis la découverte par Wyatt (1951) de la 5-méthylcytosine dans les acides nucléiques, suivie par la mise en évidence de la 6-méthylaminopurine dans les ADN bactériens (Dunn et Smith, 1955), notre compréhension des mécanismes et du rôle biologique de la méthylation des ADN semble avoir progressé par bonds.

La présence de bases mineures méthylées apparut très tôt comme un phénomène concernant les ADN des deux règnes et les ADN viraux (Dunn et Smith 1958). Cependant la part principale des recherches est revenue jusqu'au jourd'hui à l'étude des méthylations des ADN bactériens et bactériophagiques.

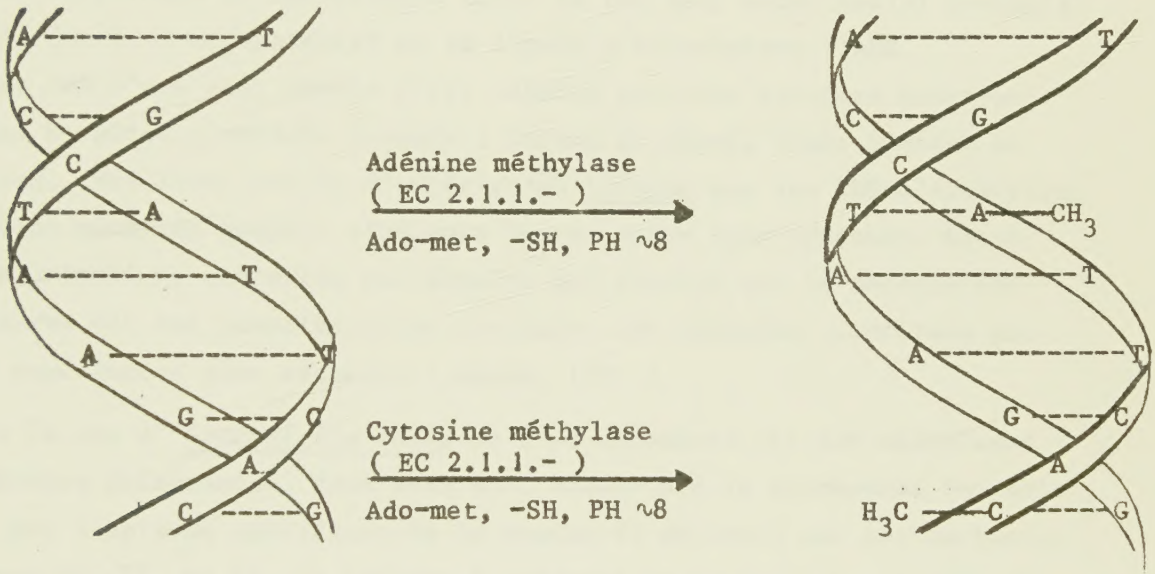
Deux sortes de méthylations de l'ADN, distinguables à partir de critères d'ordre physiologique, sont connues à ce jour. La première est la méthylation de modification, liée au phénomène de spécificité d'hôte. A cette méthylation est associée, in vivo et in vitro, une activité endonucléotidique dite de restriction. La seconde catégorie n'est pas - ou pas directement - liée au phénomène de spécificité d'hôte, et on ne connait pas d' activité endonucléolytique qui en soit la contrepartie in vivo ou in vitro. Comme le montre cette définition purement négative, il n'est pas avéré qu'il sagisse d'une catégorie homogène quant-à son rôle physiologique. En l'absence d'une connaissance exacte de ce dernier, nous traiterons cette seconde catégorie comme une catégorie homogène, sous le vocable de méthylation générale.

LA METHYLATION GENERALE :

En 1963, Gold, Hurwitz et Anders mettent en évidence l'existence d'une méthylation d'ADN in vitro par des extraits bactériens hétérologues. L'ADN alors utilisé est celui des souches rel ("Relaxed") d' E. coli K carencées en méthionine, par analogie avec la méthode utilisée pour la méthylation du t-ARN in vitro (Flessner et

Borek, 1962). L'enzyme responsable de la méthylation est présent dans les extraits bruts d'Escherichia coli, requiert de fortes concentrations d'agents sulfhydryls, mais n'a besoin d'aucun cation divalent (Gold et coll., 1963c). Il méthyle des ADN naturels hétérologues, à l'état bicaténaire, à l'exclusion de tout autre acide nucléique (Gold et Hurwitz, 1964a). La réaction enzymatique utilise la S-adénosylméthionine comme donneur de méthyles, et est irréversible.

Le schéma général de méthylation établi pour les enzymes décrits par Hurwitz et coll. (que nous appelerons enzymes de méthylation générale pour les distinguer des enzymes de modification) peut être schématisé ainsi :



La notion de site de méthylation est déduite du faible taux de bases méthylées , tant in vitro qu'in vivo. On savait en effet, depuis les travaux de Wyatt, et Dunn (1958) que le taux de bases méthylées est faible, mais variable d'une espèce à l'autre. De nombreux travaux ont confirmé cette caractéristique de la méthylation in vivo (voir en particulier Vanyushin et coll., 1968a, 1970). C'est ainsi que chez Escherichia coli C, la 6- méthylaminopurine représente 0,48 % du total des bases, et la 5-méthylcytosine 0,26 % (Vanyushin et coll, 1968b). La

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548009_0004

cytosine méthyltransférase de E. coli C reconnait une famille de sites dont la séquence globale établie par Doskocil (1965, communication aux I.E.G., Gr.7, n°111) est : 5' ---- Pu (C) C C$^{\neq}$ (T) Pu ---- 3' où les bases entre parenthèse sont facultatives , et où la base méthylée est indiquée ici par le signe ≠ .

L'ADN d'une espèce ou lignée bactérienne donnée n'est normalement pas méthylé par ses propres méthyltransférases in vitro (Gold et coll., 1963b). Ceci s'explique par le fait que l'ADN est méthylé in vivo immédiatement après sa réplication (Lark, 1968a, Billen, 1968). Par conséquent la méthylation in vitro d'un ADN hétérologue est l'indice d'une différence de spécificité entre la (ou les) méthylase(s) testée(s) et la (ou les) méthylase(s) de la lignée d'où provient l'ADN.
Cette loi n'est pas, semble t'il, valable pour les systèmes eucaryotiques. En effet plusieurs auteurs (Burdon et Adams, 1969; Sneider et Potter, 1969) ont conclu d'expériences in vivo que les ADN d'eucaryotes étaient méthylés pendant plusieurs heures après leur synthèse. Cette interprétation, contestée par Kappler qui conclut que la méthylation observée est une surméthylation anormale, est cependant confirmée par des expériences plus récentes (Adams, 1971).

Dans le cas d' Escherichia coli, on a pu dénombrer six ADN méthylases générales différentes, dont deux sont codées par le chromosome bactérien, une par l'épisome spécifique de la souche 15 et trois par les bactériophages T1, T2, et T4. Le tableau I présente les principales données concernant ces enzymes.

La recherche du rôle biologique joué par la méthylation générale a fait l'objet de nombreuses études depuis 1962 et, jusqu'à une date récente, l'expérience n'a pas confirmé les hypothèses envisagées. Citons en particulier :

Absence d'effet de la surméthylation in vitro des ADN de Pneumococcus et de Bacillus subtilis sur leurs propriétés transformantes (Gold et coll. 1966).

T A B L E A U I : ADN méthylases générales connues chez E. coli.

Enzyme	Souches	Références	Séquence	Références
Adénine méthylase	K, C, W, B, 15T$^-$	Hurwitz et coll. (1963a, 1963b).	TTA, TCA, CTA, CCA?	Doskocil et Sormova, (1965) - Vanyushin et coll. (1971a).
Cytosine méthylase	K, W, C, 15T$^-$	Hurwitz et coli. (1963a, 1963b) - Fujimoto, Srinivasan et Borek (1965)	Pu (C) CC$^+$ (T) Pu	Doskocil, (1966).
T_1 Adénine méthylase	E. coli infecté par T_1	Haussmann et Gold (1966)	?	
T_2 Adénine méthylase	" " T_2	"	même que Adénine méthylase	Vanyushin et Bur'ya-nov, (1971b).
T_4 Adénine méthylase	" " T_4	"	?	
ψ Adénine méthylase	15T$^-$, induction du phage ψ	Yudelevitch et Gold (1969) - Medoff, (1971).	?	

Absence d'effet de la surméthylation *in vitro* de l'ADN de *Micrococcus Lysodeikticus* sur sa réplicabilité par l'ADN polymérase I et sur sa transcription par l'ARN polymérase de *E.coli*. Les produits réactionnels ont des voisinages de base identiques à ceux que donne un ADN normal. (Gold et Hurwitz, 1964b).
Absence d'effet de la surméthylation *in vitro* sur la sensibilité des ADN aux nucléases (Gold et coll., 1966)

L'hypothèse faite vers 1965 d'un rôle de la méthionine dans la restriction des ADN *in vivo* (Arber, 1965) conduisit à regarder le rôle possible de la méthylation générale dans le phénomène de la modification-restriction. Pour cela, le bactériophage λ non-méthylé fut préparé en infectant des bactéries porteuses d'une S-adénosyl-méthionine hydrolase (Gefter et coll., 1966) induite par le phage T3 inactivé aux rayons ultraviolets. Les phages obtenus présentèrent le même spectre d'infectivité que des bactériophages normalement modifiés. En revanche, des expériences similaires faites avec le phage T1 (au lieu de λ) firent apparaître des différences dans le spectre d'infectivité (Klein et Sauerbier, 1965). Cependant il est difficile de dire si ces différences sont dûes à la méthylation générale ou à la modification, car l'hydrolase induite par le phage T3 a pour effet de supprimer l'une et l'autre.
En 1968, C. Lark montre que lorsqu'on remplace la méthionine par la norleucine ou l'éthionine dans une culture de *E. coli* 15T$^-$ met$^-$ en croissance exponentielle, la quantité d'ADN dans la culture double. Ensuite l'ADN synthétisé sera dégradé si la culture a été faite en milieu glucose. Les travaux ultérieurs de Lark et Arber (1970) montrent que la dégradation de l'ADN n'existe que dans les souches porteuses des systèmes de restriction 15
P1 ou RII, mais que dans les autres souches, le doublement originel de la quantité d'ADN persiste. Ce doublement avait été interprété par Lark (1968) comme traduisant l'impossibilité pour la bactérie de synthétiser un ADN non méthylé sur les deux brins. Les expériences de Lark et Arber (1970), sans exclure cette explication, montrent que si des groupes mé-

thyles de l'ADN sont des "signaux permissifs" pour la poursuite de la réplication, ils sont en nombre très limité sur le chromosome. Plus récemment, C. Lark a communiqué que la synthèse résiduelle d'ADN était un peu plus grande dans les souches non restrictives que dans les souches restrictives (Klein et Bonhoeffer, 1972) lorsque la méthionine est remplacée par un analogue.

A partir de 1971, un nouveau type de propriétés de certaines méthylations générales va recevoir des confirmations expérimentales, au travers de l'étude des interrelations entre méthylation générale et systèmes de modification-restriction. Mais avant d'aborder ces questions, il est nécessaire d'introduire la méthylation modificatrice.

LA METHYLATION MODIFICATRICE :

Contrairement aux enzymes de méthylation générale, les enzymes de modification (méthylation modificatrice) ont été isolés et purifiés en connaissance de leur fonction biologique.

A l'origine, on trouve la description de la propriété qu'ont de nombreux bactériophages d'avoir une infectivité réduite (restriction) lorsqu'ils infectent une lignée-hôte différente de leur lignée d'origine. Les bactériophages qui échappent à la restriction acquièrent par ce fait une nouvelle propriété (modification) qui les rend aptes à ne plus être restrein lorsqu'ils réinfectent la même lignée-hôte (Luria et Human, 1952 et 1953 Bertani et Weigle, 1953).

Si l'on met à part la glucosylation des phages T (Luria), les systèmes de modification-restriction obéissent aux lois suivantes :

a) - La bactérie est porteuse des déterminants génétiques de la restriction r_i et de la modification m_i . L'ADN entrant dans la cellule est soumis à la dégradation par r_i s'il vient d'une souche qui ne possède pas m_i.

b) - Les systèmes r_i et m_i sont associés dans la cellule et ce couplage génétique interdit l'auto-restriction de l'ADN dans les conditions physiologiques normales.

La typologie des systèmes de modification-restriction peut donc être établie à partir de leur propriété d'être hautement spécifiques : le taux de restriction exercé par deux systèmes associés dans la même cellule est presque toujours égal au produit des taux de restriction des systèmes pris isolément. Un bactériophage modifié pour le système 1 restera restrictible par les systèmes 2, 3, ... Enfin, il existe des lignées, comme E. coli C, qui sont dépourvues de système de modification. Ces souches servent d'indicateurs de référence pour la mesure des taux de restriction, et de donateurs de bactériophages sensibles.

C'est ainsi que chez E. coli, 7 systèmes ont pu être identifiés à ce jour (Tableau II).

TABLEAU II : Systèmes de modification-restriction portés par E. coli

SYSTEME	SOUCHES	INFECTIVITE RELATIVE DE λ .C	REFERENCES
K	K, W	$4x10^{-4}$	Weigle et Bertani, 1953
B	B	$2x10^{-4}$	Arber et Dussoix, 1962
A	A, $15T^-$	$3x10^{-2}$	Stacey, 1965 Arber et Wauters-Willems, 197
P1	E. coli (P1)	$3x10^{-5}$	Arber et Dussoix, 1962
15	$15T^-$	$2x10^{-5}$	Arber et Wauters-Willems, 197
R1	E. coli (RTF 1)	10^{-4}	Yoshimori, Roulland-Dussoix et Boyer, 1972
R2	E. coli (RTF2)	$5x10^{-3}$	Watanabe et coll., 1964

Sur les 7 systèmes qui figurent au tableau II, trois d'entre eux sont

déterminés génétiquement par le chromosome bactérien (K, B, A,) et sont alléliques (Boyer, 1964 ; Arber et Wauters-Willems, 1970). Les systèmes P1 et 15 sont portés par les épisomes prophagiques des particules P1 et γ , quant aux systèmes R1 et R2, ils sont portés respectivement par les facteurs de résistance fi^+ et fi^- .

De tous ces systèmes, on a isolé des mutants dont les phénotypes sont m^+r^- et m^-r^- (si l'on excepte les phénotypes partiels). Le phénotype m^-r^+ n'a jamais été isolé et est supposé léthal.

Pour les sytèmes K, B et A, les phénotypes m^+r^- et m^-r^- sont rencontrés en fréquence égale, ils reversent en une seule étape et se complémentent in vivo. Ces mutants sont affectés respectivement dans le cistron "de restriction" (mutants hsr m^+r^-) et dans le cistron de spécificité (mutants hsr m^-r^-). A partir des mutants hsr, on peut isoler des dérivés m^-, qui à nouveau se décomposent en deux catégories suivant qu'ils complémentent ou non les mutants hss in vivo. Ceux qui ne complémentent pas sont supposés être hsr hss, les autres sont affectés dans un cistron de méthylation hsm (mutants hsr hsm). Ces trois cistrons on pu être localisés à proximité de thr à 89 minutes sur la carte de Taylor (Wood, 1966, Lederberg, 1966). La structure fine du groupe a pu être établie (Bulkacz, Roulland-Dussoix, Boyer, résultats non publiés).

Trois pas fondamentaux ont été accomplis dans la compréhension du mécanisme de la modification-restriction, qui permirent l'isolement des enzymes qui en sont responsables :

- La démonstration, par Arber et Dussoix (1962) du fait que la modification et la restriction du bactériophage λ s'exercent sur son ADN.
- La découverte, en 1965, d'un effet spécifique de la méthionine dans l'acquisition de la modification du bactériophage λ (Arber), et de la S-Adénosyl méthionine dans l'acquisition de la modification du phage T1. (Klein et Sauerbier).
- Enfin, la mise en évidence, par Takano et coll. (1966, 1968) d'une activité de restriction in vitro du phage λ par des extraits de bactéries

Endo I⁻ porteuses du facteur N3 (RTF 2). Linn et Arber, utilisant la forme réplicative du phage fd comme substrat de la restriction in vitro, purent augmenter considérablement la sensibilité du test et montrer que les enzymes de restriction B et K exigent l'ATP et la S-adénosyl méthionine pour leur activité.

L'obtention d'enzymes de restriction purifiés a offert un moyen décisif pour la mise en évidence et la purification des enzymes de modification, reposant sur la capacité de ces derniers à rendre l'ADN résistant à l'attaque endonucléolytique in vitro comme in vivo. Cependant il faudra attendre 1972 pour que soit apportée la démonstration formelle de la méthylation de l'ADN du phage fd RF.O par l'enzyme de modification B (M.B), in vitro comme in vivo (Smith, Arber et Küehnlein, 1972a, 1972b).

Il aura donc fallu sept ans entre la mise en évidence d'un rôle spécifique de la méthionine et la démonstration de la méthylation nucléotidique comme responsable de la modification de l'ADN. La raison de cela, comme le montre la compilation présentée au tableau III, est qu'à de rares exceptions près, la méthylation modificatrice est très réduite par rapport à la méthylation générale. Ce fait est le plus marqué en ce qui concerne l'ADN bactérien ou celui du phage λ .

Quatre des sept enzymes de modification d'Escherichia coli ont été purifiés. L'enzyme M.B n'est connu qu'à l'état monofonctionnel (Lautenberger et Linn, 1972a). L'enzyme M.P1 est connu à l'état libre ou associé à l'enzyme R.P1 (Haberman et coll., 1972 ; Brockes et coll., 1972), alors que l'enzyme M.K n'est connu qu'à l'état associé à R.K (Haberman et coll., 1972). L'enzyme M.R1 a été aussi partiellement purifié (Yoshimori, 1971).

Ces quatre enzymes présentent le même type d'exigences que les méthylases générales : Ils ne sont actifs que sur un ADN bicaténaire hétérologue (non modifié) et la S-Adénosyl méthionine est le donneur de méthyles. Le magnésium n'est pas nécessaire à la réaction, qui est par contre fortement favorisée par la présence d'agents sulfhydryls. L'association de l'activité modificatrice avec l'enzyme de restriction, mise en évidence pour les enzymes M.K et M.P1, est intéressante à un

TABLEAU III : Variations du taux de méthylation des ADN suivant la spécificité d'hôte.

ADN	6-Méthyl adénine (%)			5-Méthyl cytosine (%)		
	Réf. (2)	(3)	(5)	(2)		
E. coli C	0,21			0,11		
E. coli K	0,22	0,115	0,39	0,12		
E. coli B	0,20	0,134		< 0,001		
E. coli B (P_1)	0,22			< 0,001		
E. coli K (R_{II})			0,41			
	6-Méthyl adénine (Bases/génome)			5-Méthyl cytosine (Bases/génome)		
	Réf. (1)	(2)	(5)	(1)	(2)	(5)
λ.C	123	110			50	
λ.K		110	233		50	79
λ.B	124	100		4,4	< 0,2	
λ.B (P_1)	122			5		
λ.K (R_{II})			185			171
	6-Méthyl adénine (Bases/génome)			5-Méthyl cytosine (Bases/génome)		
	Réf. (4)		(5)	(5)		
fd.C	2					
fd.K	1,8		4,8	1,7		
fd.B	4,8					
fd.K (R_{II})			4,3	3,1		

Références : (1) : Ledinko (1964)
(2) : Gough et Lederberg (1965)
(3) : Mamelak et Boyer (1970)
(4) : Smith et coll. (1972a)
(5) : Hattmann et coll. (1973)

Lorsque les auteurs concluent que la modification entraîne un changement significatif du taux de base, les valeurs concernées sont soulignées.

double titre : Les systèmes B et K sont alléliques, comme l'ont montré les études de complémentation in vivo (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969). Or l'enzyme M.B possède deux sous-unités qui sont apparemment identiques à deux des trois sous-unités de l'enzyme R.B (Lautenberger et Linn, 1972b). Il est donc probable que l'enzyme R.K, qui a la même masse que l'enzyme R.B, fonctionne comme méthylase avec deux types de sous-unités sans ATP, et comme endonucléase en tant qu'enzyme complet lorsque l'ATP est présent.

La deuxième remarque est que les enzymes R.K, R.B et R.P1 n'ont jamais été isolés à l'état monofonctionnel, et que les deux premiers exigent la S-adénosyl méthionine comme cofacteur, tandis que l'enzyme R.P1 est fortement stimulé par ce composé. L'absence d'autorestriction des souches B ou K lors de carences prolongées en méthionine pourrait s'expliquer par ce mécanisme très simple de protection. D'autre part on sait que l'ATP exerce un effet inactivateur sur l'enzyme de restriction in vitro (Meselson et Yuan, 1968). Il est possible que la S-adénosyl méthionine joue un rôle stabilisateur in vivo. En effet on sait qu'in vivo la carence en méthionine conduit à un accroissement de la proportion de cellules non-restrictives qui n'est pas reversé par simple addition de méthionine au milieu (Grasso et Paigen, 1968).

Dans le cas des enzymes de modification, le site de méthylation est plus complexe que pour les enzymes de méthylation générale. Il est possible d'analyser ce site en tant que site de restriction, si l'on admet que les enzymes M_i et R_i ont des spécificités identiques. Quoique cette hypothèse soit fréquemment admise de manière implicite, on ne peut la tenir pour certaine. Par exemple, Hattman et coll. (1973) établissent que l'ADN du bactériophage fd est modifié in vivo sans pour autant être restrictible à l'état non modifié. Horiushi et Zinder (1972) concluent de leurs expériences que les sites génétiques de la modification du phage fd par le système B ne semblent pas être les sites effectifs de coupure in vitro par l'enzyme R.B purifié.

Si ces dernières observations penchent en faveur d'une différence de spécificité des enzymes M_i et R_i (au moins dans certains cas), néanmoins

les séquences établies par l'analyse des extrémités libérées par la coupure de l'ADN du bactériophage λ avec l'enzyme R.R1 ont concordé avec celle des isostichs puriques comprenant la 6-méthylaminopurine après action de l'enzyme M.R1.
La séquence établie est celle d'un octanucléotide symétrique :

SITE D'ACTION DU SYSTEME DE MODIFICATION-RESTRICTION R1. (d'après Hedgpeth et coll.,1972 et Yoshimori et coll.,à publier)

```
                          R  M
                          ↓  ↓
5'----  A/TpGpApApTpTpCpT/A----3'
3'----  T/ApCpTpTpApApGpA/T----5'
                          ↑  ↑
                          M  R
```

R : Site de coupure
M : Site de méthylation

La présence d'une symétrie de rotation, qui avait déjà été supposée théoriquement par Arber et Linn en 1969, a été confirmée pour toutes les séquences établies jusqu'à ce jour : Haemophilus influenza Rd (Kelly et Smith, 1970) ; E. coli R2 (Boyer et coll., 1973).
Il est intéressant de noter que l'enzyme est inactif sur un ADN formé d'hétéroduplexes constitués d'un brin modifié et d'un brin non modifié (Meselson et Yuan, 1968). Cette propriété explique pourquoi l'enzyme de restriction reconnait la différence entre un ADN naissant (réplication) et un ADN étranger non modifié.

RELATIONS ENTRE METHYLATION GENERALE ET SPECIFICITE D'HOTE

Comme les enzymes de méthylation générale, les enzymes de modification sont extrêmement spécifiques et n'introduisent qu'une proportion très réduite de groupes méthyles dans l'ADN. Même si l'on suppose que toute méthylation d'une adénine ou d'une cytosine située dans un site de restriction rend celui-ci résistant à l'attaque endonucléolytique, la probalité a priori pour que la méthylation générale modifie - au sens large du terme - les sites de modification, est faible

A titre d'exemple, si une méthylase générale méthyle 1% des adénines chez E. coli, la probabilité pour qu'une base quelconque soit méthylée sera 1/400. Si un site de restriction est formé d'un octanucléotide, la probabilité a priori pour qu'une méthylation générale s'y produise sera 8/400 = 1/50. Du fait de la spécificité des enzymes, cette probabilité s'exprimera par tout ou rien : une chance sur cinquante pour que tous les sites de restriction soient affectés, et quarante-neuf chances sur cinquante pour qu'aucun ne le soit.

En dépit de cette faible probabilité a priori, plusieurs exemples d'interférence ont été décrits. Ainsi :

Les mutants totalement non glucosylés du phage T2 sont restreints par l'endonucléase de P1 in vivo (mutants T2 gt r (P1)) (Klein, 1965 ; Revel et Luria, 1970). Certains dérivés de ce mutant ont acquis la capacité d'échapper à la restriction de P1 (T2 gt u (P1)) (Revel et Georgeopoulos, 1969). Ces dérivés non glucosés ont un taux de 6-méthylaminopurine dans leur ADN trois fois plus élevé que les souches T2 gt r (P1) (Hattman, 1970). Hehlmann a pu montrer que la méthylase générale purifiée des mutants T2 gt u (P1) avait une plus grande capacité de méthylation de l'ADN de T2 que celle de T2 gt r (P1) (Hehlmann et Hattman, 1972). Dans ce cas précis, on a donc bien affaire à une interférence de la méthylation générale de T2 (voir tableau I) avec la restriction de P1 (voir tableau II), très vraisemblablement au niveau des sites de modification-restriction.

Dans le cas du système N3, la modification, au contraire de tous les autres systèmes connus, s'opère par une méthylation de cytosines (Hattman et coll., 1972 ; Hattman, 1972). Or on savait depuis plusieurs années que le taux de restriction du phage λ par le facteur RTF2 (apparenté à N3) dépendait de la souche hôte : le taux de restriction de λ.B par E. coli B (N3) est 10 à 100 fois plus élevé que celui de λ.K par E. coli K (N3) (Bannister et Glover, 1970 ; Hattman, 1972). Il était tentant d'attribuer cette différence au fait que E. coli B ne possède pas de cytosine-méthylase. Et effectivement il fut possible d'isoler des mutants sans cytosine-méthylase à partir de E. coli K en faisant la sup-

position que ces mutants auraient les mêmes propriétés que E. coli B pour la restriction du phage λ par le facteur N3 (Hattman et coll., 1973). Cette interférence est confirmée par le fait que les taux de méthylation in vivo, dont sont responsables les enzymes $M.R_{II}$ (N3) et cytosine méthylase, se sont pas additifs. Les valeurs obtenues indiquent même un taux élevé de spécificité croisée.

Les deux cas d'interférence qui viennent d'être décrits peuvent, il est vrai, être fortuits et dépourvus de signification physiologique, ou du moins pris pour tels. Le cas des mutants de l'adénine-méthylase semble plus complexe et pouvoir déboucher sur de nouvelles hypothèses quant au rôle de certaines méthylases générales.

Utilisant une technique similaire à celle employée par Bjork et Isaksson pour l'isolement de mutants des ARN méthylases, Marinus et Morris (1973) ont isolé plusieurs mutants indépendants de l'adénine-méthylase de E. coli K 12 (mutants dam). Le taux de 6-méthyladénine de leur ADN varie entre 12 et 57% du type sauvage, mais leurs extraits cellulaires sont totalement inactifs vis-à-vis de l'ADN de M. lysodeikticus.

Une propriété remarquable de ces mutants est que, alors que leur activité modificatrice in vivo est normale, ils restreignent le phage λ à des taux très inférieurs au type sauvage.

Il est possible que cette dernière lésion dans la capacité de restriction (type K) soit dûe à un effet pléiotrope de la mutation dam, qui a été localisée à un emplacement du chromosome très différent de celui qu'occupe le groupe des gènes hs. Une explication plus plausible vient du fait que malgré leur restriction réduite, les mutants dam ont un ADN qui tend à se dégrader in vivo (Morris, communication personnelle). Il est donc possible qu'il s'agisse de doubles mutants, le mutant simple étant non-viable dans cette hypothèse.

Quoiqu'il en soit de la nature exacte de ces mutants, il est clair que l'adénine méthylase est "en un certain sens" un enzyme de modification. La question est ouverte de savoir vis-à-vis de quoi : il faut noter que malgré certaines incertitudes sur la validité du modèle à trois

gènes (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969), aucune des mutations secondaires obtenues jusqu'à présent à partir de mutants m^+r^- ne s'est trouvée localisée hors de la région hs du chromosome bactérien.

Le travail qui a être exposé a trait à la méthylation générale chez Escherichia coli K 12. Comme il est dit plus haut, rien ne permet d'affirmer a priori qu'il s'agit d'une catégorie hémogène sur le plan de son rôle physiologique. (1)

Nous avons donc été frappés par le fait que les Adénine et Cytosine-méthylases restaient apparemment associées lors de leur purification (Hurwitz, 1964).
L'absence de cytosine méthylase chez E.coli B et l'induction d'une seule activité Adénine méthylase par le phage T_2 infectant E. coli K_{12}, quoiqu'ils suggèrent une nature distincte des deux activités (Srinivassan et Borek, 1965), ne permettent pas de conclure dans ce sens avec certitude. Je me suis donc attaché à purifier ces enzymes, et à mettre en évidence leurs caractères distinctifs (Sections I et II).

(1) Au contraire, on sait aujourd'hui que, alors que les mutants dam exhibent des propriétés très particulières, les mutants de la cytosine méthylase dcm (Marinus et Morris, 1973) ou les recombinants sans cytosine méthylase obtenus par conjugaison avec E. coli B après abolition de la barrière de spécificité (souches mec, Mamelak et Boyer, 1970), n'ont aucune propriété inattendue. Ce sont, en quelque sorte, des "E. coli B à spécificité K".

Dans un deuxième temps, j'ai cherché, sur la base de l'hypothèse de C. Lark, à préciser les relations entre méthylation et replication de l'ADN dans un système in vitro. Ce travail n'est pas exposé ici, parce que je n'ai pu obtenir le doublement de la quantité d'ADN après remplacement de la méthionine par un analogue, avec les souches en ma possession. J'ai alors fait appel à une souche dna B afin de disposer d'un système amplificateur pour les synthèses résiduelles.
D'une manière assez surprenante, la synthèse résiduelle sans méthionine s'est montrée indépendante de la barrière du dédoublement postulée par C. Lark. Par contre, un effet de la méthionine sur la limitation de la replication, distinct à la fois des processus de méthylation et de synthèse protéique connus, a pu être mis en évidence. D'autre part, l'emploi de mutants DNA B m'a permis de réaliser les conditions d'une synthèse d'ADN non méthylé sur les deux brins (Section 3).
La possibilité ainsi offerte de comparer un ADN non méthylé à un ADN non modifié (c'est-à-dire un ADN ayant reçu la méthylation seule) fournit un moyen puissant pour la mise en évidence d'interrelations entre méthylation générale et modification-restriction in vitro.
Cette étude est abordée dans la section 4.

BIBLIOGRAPHIE :

ADAMS, R.L.P., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 95, 515.

ARBER, W., (1965) *J. Mol. Biol.*, 11, 247.

ARBER, W., et LINN S., (1969) *Annu. Rev. Biochem.*, 38, 467.

ARBER, W., et MORSE, M.L. (1965) *Genetics*, 51, 137.

ARBER, W., et ROULLAND-DUSSOIX, D., (1962) *J. Mol. Biol.*, 5, 18.

ARBER, W., et WAUTERS-WILLEMS, D., (1970) *Mol. Gen. Genet.*, 108, 203.

BANNISTER, D., et GLOVER, S.W., (1970), *J. Gen. Microbiol.*, 61, 63.

BERTANI, G., et WEIGLE, J.J., (1953) *J. Bacteriol.*, 65, 113.

BILLEN, D., (1968) *J. Mol. Biol.*, 31, 477.

BJORK, G.R., et ISAKSSON, L.A., (1970) *J. Mol. Biol.*, 51, 83.

BOYER, H.W., (1964) *J. Bacteriol.*, 88, 1652.

BOYER, H.W., CHOW, L.T., DUGAICZYK, A., HEDGPETH, J., et GOODMAN, H.M., (1973) *Nature*, 244, 40.

BOYER, H.W., et ROULLAND-DUSSOIX, D., (1969) *J. Mol. Biol.*, 41, 459.

BROCKES, J.P., BROWN, P.R., et MURRAY, K., (1972) *Biochem. J.*, 127, 1.

BURDON, R.H., et ADAMS, R.L.P., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 322.

DOSKOCIL, J., et SORMOVA, Z., (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 95, 515.

DUNN, D.B., et SMITH, J.D., (1955) *Nature*, 175, 336.

DUNN, D.B., et SMITH, J.D., (1958) *Biochem. J.*, 68, 627.

FLESSNER, E., et BOREK, E., (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1199.

FUJIMOTO, D., SRINIVASAN, P.R., et BOREK, E., (1965) *Biochemistry*, 4, 2849.

GEFTER, M., HAUSSMAN, R., GOLD, M., et HURWITZ, J., (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1995.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1964a) *J. Biol. Chem.*, 239, 3858.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1964b) *J. Biol. Chem.*, 239, 3866.

GOLD, M., HURWITZ, J., et ANDERS, M., *Biochim. Biophys. Res. Commu.*, 11, 107.

GOLD, M., HURWITZ, J., et ANDERS, M., (1963b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 50, 164.

GOLD, M., HURWITZ, J., et ANDERS, M., (1963c) Cold Spring Harbor *Symp. Quant. Biol.* 28, 149.

GOLD, M., et GEFTER, M., HAUSSMAN, R., et HURWITZ, J., (1966) *Macromolecular metabolism* Symposium de la "New-York Heart Association" J. et A. Churchill Ltd Londres, 1966.

GOUGH, M., et LEDERBERG, S., (1965) *J. Bacteriol*, 91, 1460.

GRASSO, R.J., et PAIGEN, K., (1968) *Virology*, 36, 1.

HABERMAN, A., HEYWOOD, J., et MESELSON, M., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3138.

HATTMAN, S., (1970) *Virology*, 42, 359.

HATTMAN, S., (1972) *J. Virol.*, 42, 359.

HATTMAN, S., GOLD, E., PLOTNIK, A., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69, 187.

HATTMAN, S., SCHLAGMAN, S., et COUSENS, L., (1973) *J. Bacteriol.*, sous presse.

HAUSSMAN, R. et GOLD, M., (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1985.

HEDGPETH, J., GOODMAN, H.M., et BOYER, H.W., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 69, 3448.

HEHLMANN, R., et HATTMAN, S., (1972) *J. Mol. Biol.*, 67, 351.

HORIUSHI, K., et ZINDER, N.D., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3220.

KAPPLER, J.W., (1970) *J. Cell. Phys.*, 75, 21.

KELLY, T.J.Jr; et SMITH, H.O., (1970) *J. Mol. Biol.*, 51, 393.

KLEIN, A., (1965) *Z. Vererbungsl.*, 96, 346.

KLEIN, A., et SAUERBIER, W., (1965) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 18, 440.

KLEIN, A., et BONHOEFFER, F., (1972) "DNA Replication" dans *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 301.

LARK, C., (1968a) *J. Mol. Biol.*, 31, 389.

LARK, C., (1968b) *J. Mol. Biol.*, 31, 401.

LARK, C., et ARBER, W., (1970) *J. Mol. Biol.*, 52, 337.

LAUTENBERGER, J.A., et LINN, S., (1972a) *J. Biol. Chem.*, 247, 6176.

LAUTENBERGER, J.A., et LINN, S., (1972b) *J. Biol. Chem.*, 247, 6183.

LEDERBERG, S., (1966) *J. Bacteriol.*, 91, 1029.

LEDINKO, N., (1964) *J. Mol. Biol.*, 9, 834.

LINN, S., et ARBER, W., (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 59, 1300.

LURIA, S.E., (1953) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18, 237.

LURIA, S.E., et HUMAN, M.L., (1952) *J. Bacteriol.*, 64, 557.

MAMELAK, L., et BOYER, H.W., (1970) *J. Bacteriol.*, 104, 57.

MARINUS, M.G., et MORRIS, N.R., (1973) *J. Bacteriol.*, 114, 1143.

MEDOFF, G., (1971) *Virology*, 43, 642.

MESELSON, M., et YUAN, R., (1968) *Nature*, 217, 1110.

REVEL, H.R., et GEORGOPOULOS, C.P., (1969) *Virology*, 40, 1.

REVEL, H.R., et LURIA, S.E., (1970) *Ann. Rev. Genet.*, 4, 177.

SNEIDER, T.W., et POTTER, V.R., (1969)
J. Mol. Biol., 42, 271.

SMITH, J.D., ARBER, W., et KÜHNLEIN, U., (1972a)
J. Mol. Biol., 63, 1.

SMITH, J.D., ARBER, W., et KÜHNLEIN, U., (1972b)
J. Mol. Biol., 63, 9.

STACEY, K.A., (1965) *Brit. Med. Bull.*, 21, 211.

TAKANO, T., WATANABE, T., et FUKASAWA, T., (1966)
Biochim. Biophys. Res. Commun., 25, 192.

TAKANO, T., WATANABE, T., et FUKASAWA, T., (1968)
Virology, 34, 290.

VANYUSHIN, B.F., BELOZERSKY, A.N., KOKURINA, N.A., et KADIROVA, D.X., (1968).
Nature, 218, 1066.

VANYUSHIN, B.F., BOYARSKIKH, NIKOLSKAYA, I.I., LYSENKO, A.M., et TIKHONENSKO, T.I., (1971) *Akad. Nauk. Ser. Biol.*, 201, 234.

VANYUSHIN, B.F., BUR'YANOV, Ya.I., BELERZKY, A.N., (1971)
Nature, 230, 25.

VANYUSHIN, B.F., TKACHEVA, S.G., BELOZERSKY, A.N., (1970)
Nature, 225, 948.

WEIGLE, J.J., et BERTANI, G., (1953)
Ann. Inst. Pasteur, 84, 175.

WOOD, W.B., (1966) *J. Mol. Biol.*, 16, 118.

WYATT, G.R., (1951) *Biochem. J.*, 48, 581.

YOSHIMORI, R., ROULLAND-DUSSOIX, D., et BOYER, H., (1972)
J. Bacteriol., 112, 1275.

YOSHIMORI, R., (1971) Thèse de Ph. D., Univ. Californie, San Francisco.

YUDELEVITCH, A., et GOLD, M., (1969)*J. Mol. Biol.*, 40, 77.

PURIFICATION DES ADN METHYL TRANSFERASES D'ESCHERICHIA COLI K_{12}

1 - 1 : INTRODUCTION.

1 - 2 : MATERIEL ET METHODES.

1-2-1 : Souche et conditions de croissance.

1-2-2 : Préparation des substrats.

1-2-3 : Conditions de mesure de l'activité totale.

1-2-4 : Conditions de mesure des rapports $\frac{\text{6 Méthyladénine}}{\text{5 Méthylcytosine}}$

1 - 3 : METHODE DE PURIFICATION DES ENZYMES.

1-3-1 : Extrait brut.

1-3-2 : Système de phases polyéthylèneglycol-dextrane.

1-3-3 : Adsorption et élution fractionnée sur gel d'alumine.

1-3-4 : Chromatographie sur gel d'hydroxyapatite.

1-3-5 : Chromatographie sur gel de Sulfoéthyl-Séphadex A-50.

1 - 4 : DEGRE DE PURIFICATION ENZYMATIQUE.

1-4-1 : Perte préférentielle de la Cytosine-méthylase.

1-4-2 : Séparation des activités Adénine et Cytosine-méthylase.

1-4-3 : Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide et degré de pureté.

1-4-4 : Absence d'activité t-RNA méthylasique.

1-4-5 : Importance de l'activité modificatrice.

1 - 5 : CONCLUSION.

1 - 6 : BIBLIOGRAPHIE.

1 - 1 : INTRODUCTION.

La méthode de purification des ADN méthyltransférases décrits par M. Gold et J. Hurwitz (1964a) a permis à ces auteurs l'étude de quelques propriétés fondamentales de la réaction de méthylation *in vitro* (1964a, 1964b). Toutefois, cette méthode présente plusieurs inconvénients :

- Faible rendement (15 %) pour un degré de purification médiocre (environ x 400).
- Irreproductibilité provenant de l'instabilité des fractions issues des gels de phosphate de calcium, et de la chromatographie sur colonne de phosphocellulose.
- Grande variation du rapport des activités Adénine-méthylase et Cytosine-méthylase d'une préparation à l'autre (communication personnelle du D^{r} J. Hurwitz).

Pour ces raisons, une nouvelle mise au point de la purification des ADN méthylases d'*Escherichia coli* K_{12} a été entreprise. La méthode décrite dans la section 1-3 écarte pour l'essentiel les trois inconvénients qui viennent d'être cités.

1 - 2 : MATERIEL ET METHODES.

1-2-1 : Souche et conditions de croissance :

Les souches Endo 1^{+} fournissent des extraits bruts pour lesquels les cinétiques de méthylation ne sont pas linéaires. Ceci provient de la dégradation de l'ADN substrat ajouté. J'ai donc fait appel à la souche d'*Escherichia coli* MRW 25 (Endo 1^{-}) isolée par M. Michel Wright (1971). La souche est cultivée en milieu M.L. (Bactotryptone : 10 g/l ; extrait de levure : 5 g/l : NaCl 5 g/l ; KOH qsp PH 7,3.) avec du glucose à 1°/$_{oo}$. Un examen préliminaire ayant montré que l'activité spécifique des DNA méthylases dans les extraits bruts est indépendante du stade de croissance, les bactéries sont cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle, lavées avec le tampon Tris-HCl 10^{-2} M, PH 8, et gardées à -20° C.

1-2-2 : Préparation des substrats.

- L'ADN de Micrococcus lysodeikticus a été préparé par la méthode de Marmur (1961), les déprotéinisations étant effectués à l'aide de phénol au lieu du mélange chloroforme-alcool isoamylique. Dans certains cas, cet ADN a été repurifié sur une colonne d'hydroaxyapatite en présence de KCl 3 M, selon la méthode de Bernardi (1969).

- La S-Adénosyl méthionine L *Me* ^{14}C provient du C.E.A. ou de Amersham. Son activité spécifique varie de 25 à 50 mCi/mM suivant les lots.

- La S-Adénosyl méthionine non radioactive a d'abord été repurifiée à partir des poudres commerciales par des méthodes chromatographiques. Mais la basse teneur de ces poudres en S-Adénosyl méthionine m'a conduit à préparer directement ce substrat à partir de la levure de boulangerie d'après la méthode de Schlenk et coll. (1965). La variante de l'extraction perchlorique à 0° C a été choisie, elle limite l'extraction au contenu vacuolaire sans affecter le rendement en dérivé sulfonium. La S-Adénosyl méthionine obtenue, contrôlée par chromatographie sur plaque de cellulose avec le solvant éthanol/acide acétique/eau : 63/1/34, a moins de 5 % d'impuretés. Elle est stockée à -20° C dans H_2SO_4 0,1 N et n'est pas neutralisée avant usage.

1-2-3 : Conditions de mesure de l'activité totale.

Le milieu d'incubation (200 µl) comprend, outre l'enzyme :

Tampon Tris-HCl à 100 mM, PH 8,0.
KCl à 50 mM
E.D.T.A. à 5 mM
2-Mercaptoéthanol à 50 mM
S-Adénosyl méthionine à 30 µM et 20 c.p.m. ^{14}C/pM.
ADN de M. Lysodeikticus à 500 µM en résidus nucléotidiques.

Quand de l'enzyme purifié est utilisé, le milieu d'incubation comprend en outre 200 ug de sérumalbumine bovine. La quantité d'enzyme est choisie de manière à ce que l'incorporation n'excède pas 300 à 400 pM.

Après 15 à 60 minutes à 37° C, la réaction est arrêtée par addition sous agitation d'un excès d'acide trichloroacétique froid à 5 %, puis le précipité est filtré sur filtre cellulosique (diamètre des pores : 0,45 µm), lavé par l'acide trichloracétique à 5 % et séché. La radioactivité fixée aux filtres est comptée dans des fioles contenant 10 ml de liquide scintillant 2,5 -diphényloxazole : 5 g ; 1,4- bis (5 phényl oxazolyl-2)-benzène : 0,25 g ; dans 1 l. de toluène, à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Une unité d'enzyme est définie dans ce travail comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'incorporation d'une picomole de groupes méthyls par minute dans le test décrit ci-dessus.

1-2-4 : Conditions de mesure des rapports $\frac{\text{6 Méthyladénine}}{\text{5 Méthylcytosine}}$.

Pour la mesure de la part revenant à chacune des deux activités, une technique a été mise au point, permettant de faire cette détermination sur des duplicats d'incubation standard. En fin d'incubation de ces duplicats, des billes de verres (diamètre = 180 µm) sont ajoutés. Puis de l'acide trichloracétique à 5 % est versé doucement pour coprécipiter l'ADN, les protéines et les billes. Le précipité est gardé pendant 15 minutes à 0° C, puis lavé par décantation avec de l'acide trichloracétique à 5 %. Les billes de verre facilitent cette décantation en alourdissant le précipité ; de plus, elles améliorent ultérieurement l'homogénéisation de la solution obtenue à partir du résidu de l'hydrolysat. Après cinq à six lavages, l'excès de liquide est drainé hors du précipité par ponction capillaire, puis le précipité est transféré dans des tubes de verre (d = 2 mm, h = 40 mm) avec 20 µl d'acide formique pur. Le tube est scellé puis porté à 175° C pendant 30 minutes. L'hydrolysat qui contient les bases libres (Chargaff, 1948) est ensuite séché, repris dans quelques microlitres d'eau et appliqué sur une plaque de cellulose-polyéthylèneimine, et chromatographié avec de l'eau ammoniaquée (PH 10,4) comme solvant. Les taches radioactives sont repérées par un lecteur à méthane, et mesurées soit par ce moyen, soit par scintillation liquide après leur découpe. Le rendement de la méthode varie de 50 % à 90 %.

Dans ces conditions chromatographiques, la 6 méthylaminopurine a pour R^f 0,34 et est proche des autres purines (R^f 0,28). La 5 méthylcytosine migre avec les autres bases pyrimidiques (R^f 0,69). Seules ces deux bases méthylées ont été détectées, quelque soit le solvant employé.

Pour la détermination du rapport des activités caractéristique d'une fraction enzymatique donnée, le rapport 6 méthyladénine/5 méthylcytosine est mesuré après des temps variables d'incubation à 37° C. Ce rapport décroit à peu près linéairement avec le temps pendant la première heure. La valeur obtenue par extrapolation au temps zéro est considérée comme caractéristique de la fraction.

1 - 3 : METHODE DE PURIFICATION DES ENZYMES.

Toutes les opérations sont effectuées à 4° C. Les tampons contiennent du 2-mercaptoéthanol à 50 mM.

1-3-1 : Extrait brut :

Une masse de bactéries est broyée avec 2,1 masses d'alumine lévitée dans un mortier refroidi. Quand le mélange a atteint la viscosité et l'homogénéité voulues, il est suspendu dans des quantités croissantes de tampon Tris-HCl 10 mM, PH 8 ; EDTA 1 mM, jusqu'à trois masses. L'alumine et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20000 g pendant 15 minutes. Le surnageant (extrait brut) contient une activité d'autométhylation de constituants précipitables par l'acide trichloracétique. L'identité de cette méthylation n'a pas été recherchée. Cette activité n'est mise en évidence que dans l'extrait brut.

1-3-2 : Système de phases Polyéthylèneglycol-dextrane :

A sept volumes d'extrait brut, on ajoute deux volumes d'une solution de Polyéthylèneglycol 6000 (Compt. Franc. Prod. Arom.) à 30 % en poids, puis un volume de Dextran T 500 (Pharmacia) à 20 % en poids. Du NaCl solide est ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,14 M, puis le mélange est agité pendant 30 minutes et centrifugé. Le coefficient de partage de l'enzyme, défini suivant Albertssön (1960), est alors minimal et vaut 2×10^{-2}. La phase supérieure est jetée et remplacée par

un volume égal d'une solution de polyéthylène glycol à 6,6 % dans le tampon Tris-HCl 10 mM, PH 8. Du NaCl solide est ajouté jusqu'à une concentration finale de 1,5 M, le mélange est agité une heure et centrifugé. A cette concentration saline, le coefficient de partage est voisin de l'unité, et l'activité enzymatique est principalement dans la phase supérieure, qui est gardée.

Dès ce stade de purification, les concentrations protéiques peuvent être grossièrement estimées d'après les rapports d'absorption à 260 et 280 nm.

1-3-3 : Adsorption et désorption fractionnée sur gel d'alumine :

Du gel d'alumine (C γ Biorad) à 25 mg de solides par millilitre, est ajouté à la phase supérieure jusqu'à un rapport de masse solides/ protéines voisin de 1. Après cinq minutes d'agitation, la suspension est sédimentée. Le précipité est lavé une fois avec le tampon Tris-HCl 10mM, PH 8,0 puis une première fraction protéique est éluée par quatre extractions et centrifugations successives avec le tampon Phosphate de K 0,15 M PH 6,75. Enfin l'activité enzymatique est éluée par trois extractions et centrifugations successives avec le tampon Phosphate de K 0,1 M + $(NH_4)_2SO_4$ M ; PH 7,1. Ces trois derniers éluats combinés sont portés à une concentration de 0,1 M avec du Tris-HCl, PH 8 puis à $(NH_4)_2SO_4$ 3 M avec du sulfate d'ammonium solide. Après sédimentation, les protéines sont redissoutes dans le minimum de tampon Tris-HCl 10 mM, PH 8,0. La fraction obtenue (Fraction AS) précipite à basse force ionique et n'est stable qu'à -196° C.

1-3-4 : Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite :

Une colonne d'hydroxyapatite (Clarkson) est équilibrée avec le tampon Phosphate de Na 1 mM, PH 7 + NaCl 0,6 M. Grâce à la force ionique élevée en anions monovalents non éluants, la fraction protéique, qui est équilibrée avec ce tampon par filtration sur une colonne de Biogel P6 (50-100 mesh), reste à l'état non agrégé. Les protéines sont appliquées sur la colonne à raison de 5 mg par millilitre d'hydroxyapatite. Elles sont éluées par un gradient de tampon Phosphate de Na

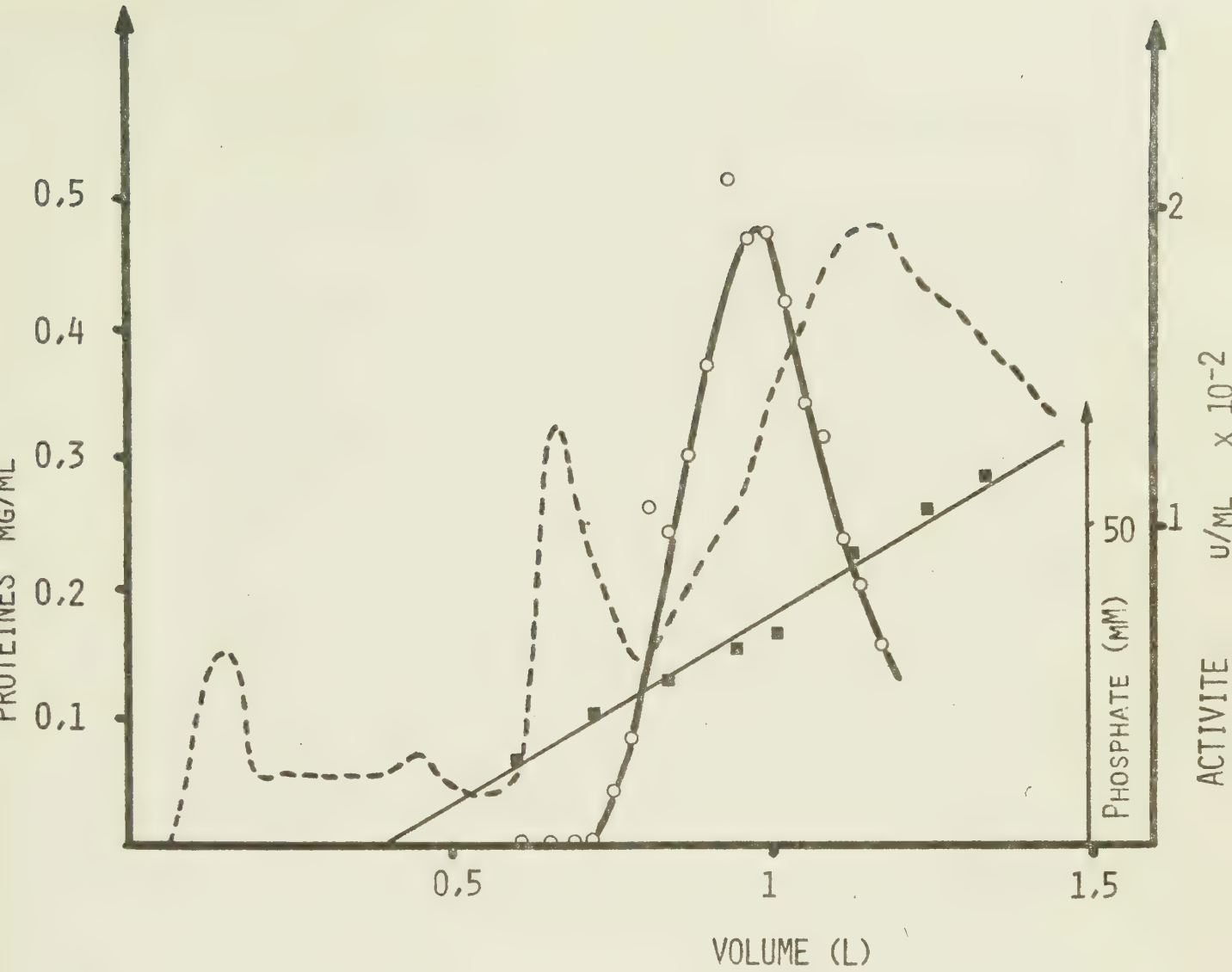


FIGURE 1 : CHROMATOGRAPHIE PRÉPARATIVE DES ADN MÉTHYLASES SUR COLONNE HYDROXYAPATITE

Un échantillon contenant 75 000 unités d'enzyme et 660 mg de protéines dans 26 ml est chromatographié sur une colonne de 2,5 x 22 cm.

Elution par un gradient linéaire de 2 litres, de Phosphate de Na 1 mM + NaCl 0,6 M, PH 7 à Phosphate de Na 70 mM + NaCl 0,6 M, PH 7

Volume des fractions recueillies : 30 ml.

Dosage de l'enzyme : 20 minutes à 37° C avec 20 µl d'éluat. (o—).

Les protéines sont estimées à partir des absorptions à 260 et 280 nm. (---).

de 1 à 70 mM, PH 7, la concentration en NaCl restant fixée à 0,6 M. L'activité est éluée aux alentours de 30 mM de phosphate (figure 1).

1-3-5 : Chromatographie sur gel de Sulfoéthyl Séphadex A 50 :

La fraction active issue de la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite ne précipite que très peu à basse force ionique. Elle est filtrée sur une colonne de Biogel P6 (50-100 mesh) pour être transférée dans le tampon Phosphate de K 0,15 M, PH 6,5 + EDTA 1 mM. Elle est appliquée sur une colonne de Sulfoéthyl-Séphadex A 50 (Pharmacia) équilibrée avec ce tampon, à raison de 5 mg de protéines par millilitre de gel.

La figure 2 montre le profil d'élution par un gradient de phosphate de potassium. En pratique, on élue l'enzyme par le tampon Phosphate de K 0,35 M, PH 6,5. La fraction finale (fraction SE) est dialysée contre le tampon Phosphate de K 0,1 M, PH 7,0 + EDTA 1 mM + 2-mercaptoéthanol 50 mM contenant 50 % de glycérol. Après équilibre de la dialyse, la fraction finale peut être conservée entre -10° C et -20° C, sans perdre d'activité pendant plusieurs mois.

Le tableau I présente le fractionnement des DNA méthylases à partir de 340 grammes de bactéries.

1 - 4 : DEGRE DE PURETE DES ADENINE ET CYTOSINE METHYLASES :

1-4-1 : Perte préférentielle de la Cytosine-méthylase :

Le tableau I montre la variation du pourcentage d'activité Adénine-méthylase dans le cours d'une purification. La purification de l'activité Cytosine-méthylase y est cinq fois moindre que celle de l'activité Adénine-méthylase. La perte la plus marquée d'activité cytosine méthylase se produit lors des deux premières étapes de purification. Cependant, aucune étape de la purification n'a permis de mettre en évidence une désorption, élution, etc.... à caractère biphasique.

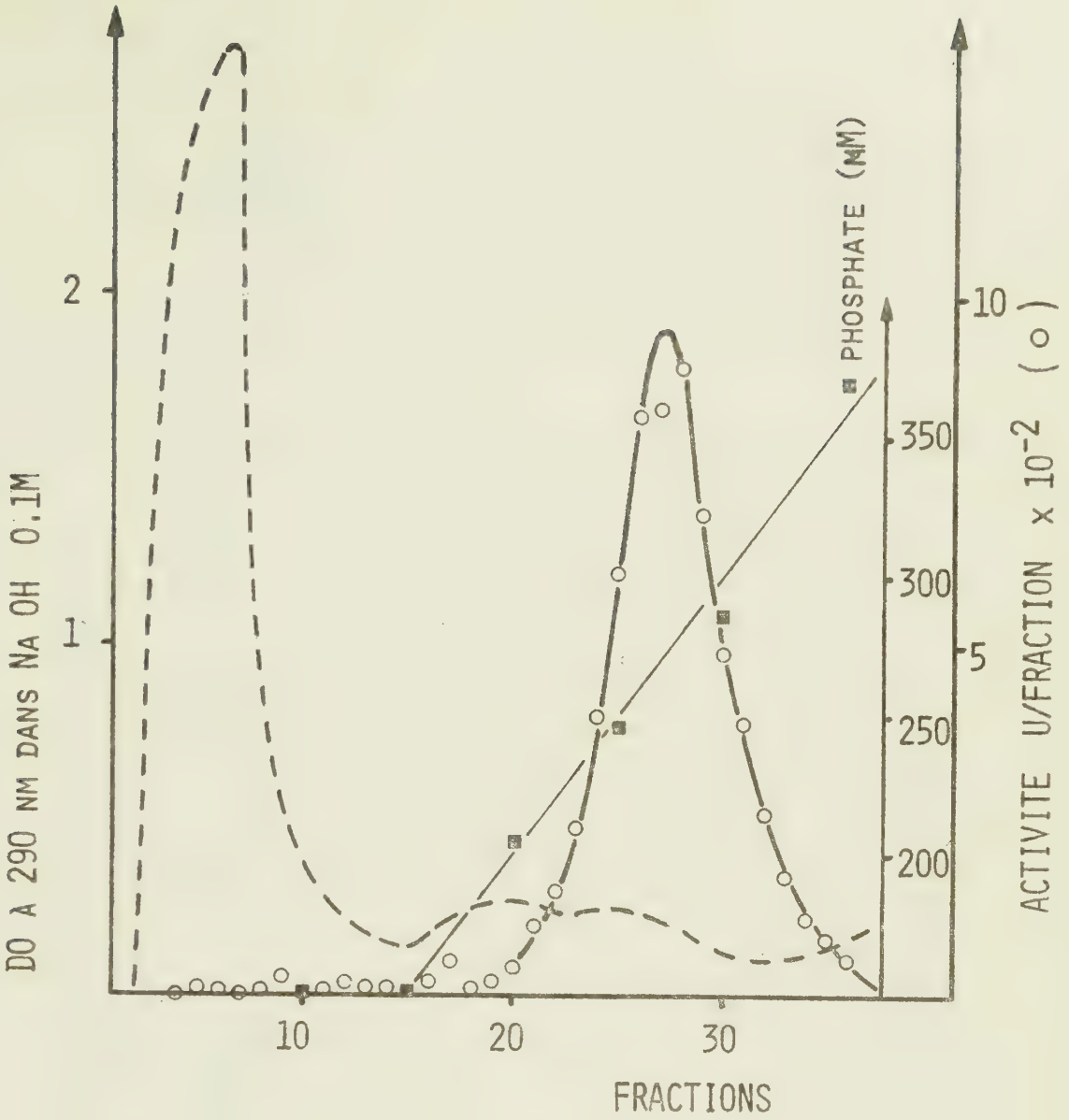


FIGURE 2 : CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE ADN MÉTHYLASES SUR COLONNE DE SULFOÉTHYL-SÉPHADEX A 50.

Un échantillon contenant 4900 unités et 29 mg de protéines dans 4 ml est chromatographié sur une colonne de 4,5 ml de S.E.-Séphadex.
L'activité est éluée par un gradient de 100 ml de Phosphate de K 0,15 M PH 6,5 à Phosphate de K 0,5 M PH 6,5 contenant:
2-mercaptoéthanol 5×10^{-2} M, EDTA 10^{-3} M, et Glycérol 20 %.
Fractions recueillies : 1,9 ml. Dosage de l'enzyme : 30' à 37° C avec 10 µl d'éluat. (o —). Densité optique : -----.

T A B L E A U I : PURIFICATION DES ADN METHYLASES DE E. COLI K_{12}
à partir de 340g de bactéries.

FRACTION	Activité totale	Concentration protéique	Volume	Activité spécifique	Purification	Rendement	Activité adénine méthylase
	Unités	mg/ml	ml	Unités/mg	- fois	%	%
Extrait brut	230 000	26,5	1 105	8	1	100	48
Phase Polyéthylène Glycol II	193 000	5,8	1 205	28	3,5	84	N.T.
Fraction Sulfate d'ammonium (AS)	160 000	18,4	42	206	26	70	66
Eluat hydroxyapatite	103 500	6×10^{-2}	720	2 350	300	44	75
Eluat Sulfoéthyl séphadex	45 000	0,37	8	15 000	1 900	19	82
Fraction finale S.E.	32 000	1,5	2	10 700	1 350	14	82

1-4-2 : Séparation des activités Adénine et Cytosine-méthylase :

A deux reprises, il a été possible de séparer, partiellement dans un cas, totalement dans l'autre, les deux activités sur colonne de Sulfoéthyl-Séphadex. Dans un de ces cas, l'activité Adénine-méthylase fut éluée par le même tampon phosphate de K 0,5 M, PH 7,5 que l'activité Cytosine-méthylase, mais avec un retard à l'élution. Ce résultat n'a pu être reproduit.

1-4-3 : Mobilité sur gel d'acrylamide et degré de pureté :

Pour déterminer les propriétés de migration en gel d'acrylamide des deux activités et leur association aux protéines de la fraction SE, celle-ci est soumise à l'électrophorèse de la manière suivante ; Des gels à 5 % d'acrylamide préparés dans le tampon d'électrophorèse Phosphate de K 0,1 M, PH 6,2 sont soumis à sept heures de préélectrophorèse (champ : 7 V/cm^{-1}) à 3° C. La cathode est reliée au réservoir supérieur. Le PH des tampons d'électrode est gardé constant par recyclage via une pompe péristaltique et un trop-plein. Un échantillon de 10 µl de fraction SE (soit 160 u et 30 µg) dilué dans 100 µl de tampon contenant 10 % de glycérol, est ensuite déposé au sommet du gel. Après un temps variable d'électrophorèse comme précédemment, les gels sont :

- soit fixés et colorés avec du Bleu de coomassie à 0,1 % dans l'acide acétique 10 % puis décolorés dans l'acide acétique 10 % ;
- soit coupés en tranches qui sont mises à diffuser à 4° C pendant plusieurs heures dans 200 µl de milieu d'incubation, puis incubées pendant deux ou quatre heures à 37° C dans ce même milieu.

La figure 3 montre les profils de protéines et d'activité après une électrophorèse de quatorze heures. Le profil d'activité, qui n'est bien résolu qu'après dix heures d'électrophorèse, met en évidence un pic d'activité Cytosine-méthylase migrant légèrement plus vite qu'un pic d'activité Adénine-méthylase. Un second pic d'activité Adénine-méthylase migrant lentement est présent dans la plupart des cas. Cette figure est difficilement interprétable. En effet, pour des temps d'électrophorèse plus longs, la migration ralentit, la résolution décroit et l'activité Adénine-méthylase disparaît peu à peu.

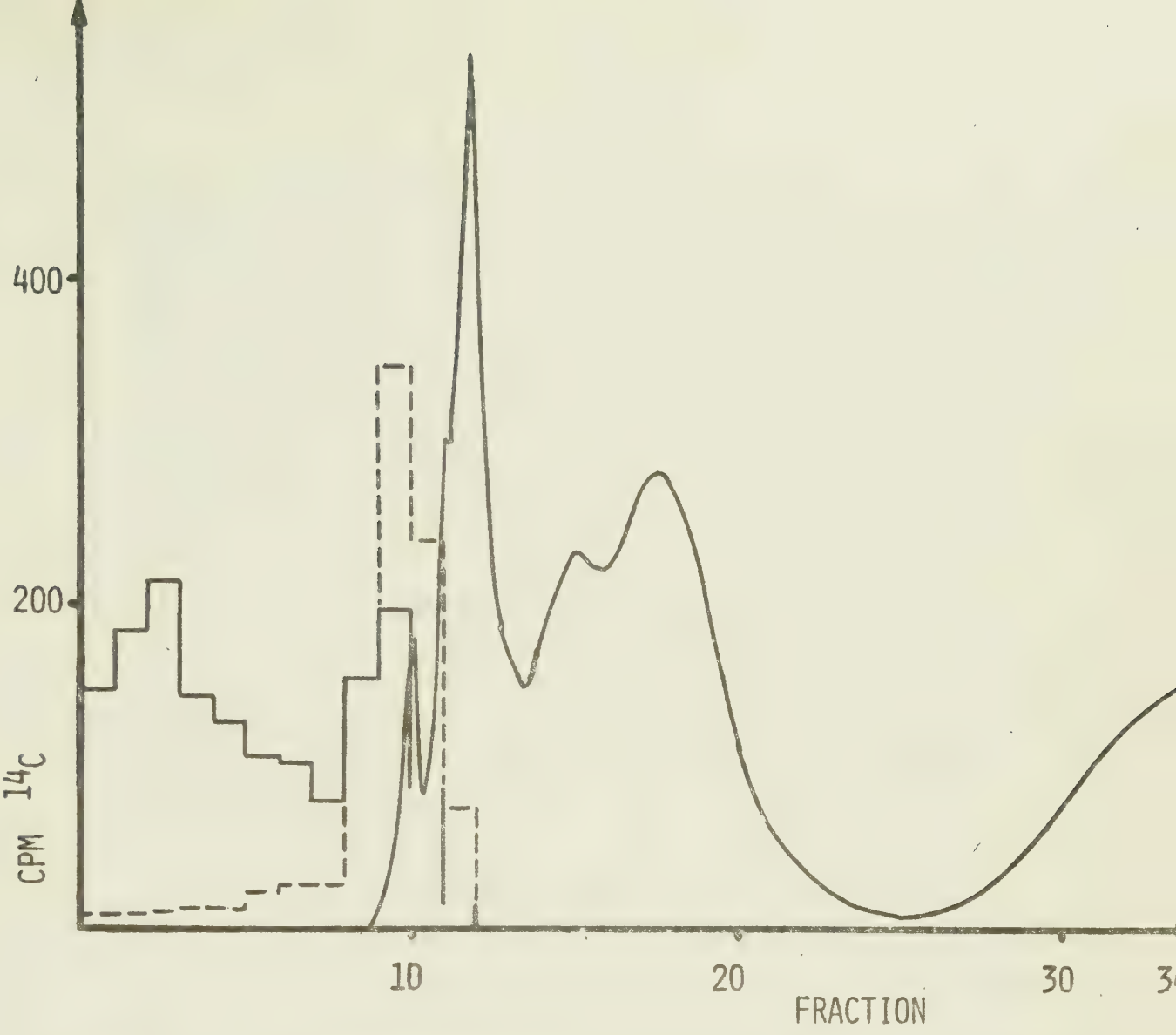


FIGURE 3 ELECTROPHORÈSE DE LA FRACTION SE SUR GEL D'ACRYLAMIDE A 5 %

Deux gels sont soumis à l'électrophorèse pendant 14 heures dans un champ électrique de 7 Volts/cm. A la fin de l'électrophorèse, le premier gel est coupé en tranches de 2 mm. Chaque tranche est incubée une nuit à 4° C puis pendant quatre heures à 37° C dans 200 µl de milieu d'incubation. Courbes discontinues:

———— , activité adénine méthylase; - - - - -,activité cytosine méthylase

Le second gel est coloré au bleu de Coomassie et l'absorption est mesurée dans un "chromoscan" (Gilford). Courbe continue: ———— , absorption (u.a.)

Au-delà de quinze heures d'électrophorèse, les profils d'activité et de protéines sont totalement séparés ; aucune coloration de protéines n'apparaît dans la zone où sont les activités, et les fractions colorables sont dépourvues d'activité. Ceci reste vrai lorsque les protéines sont fixées par l'acide trichloracétique à 50 %. Compte tenu de la sensibilité de l'enregistreur d'absorption (Gilford Instruments), on peut conclure que les enzymes représentent moins de 5 % des protéines de la fraction SE. Ceci implique que les ADN méthyl-transférases,devraient être purifiées au moins 20 000 à 30 000 fois pour être pures.

1-4-4 : Absence d'activité t-ARN méthylasique :

L'enzyme purifié (12 unités) incubé avec 40 µg de t-ARN de levure, au lieu de l'ADN, incorpore moins de deux picomoles de groupes méthyls après une heure d'incubation dans le milieu standard à 37° C. L'activité t-ARN méthylasique est donc inférieure à 1/360ème de l'activité ADN méthylasique.

1-4-5 : Activité modificatrice de l'enzyme purifié :

Lorsque la purification des ADN méthylases a été entreprise, l'activité modificatrice M.K n'avait pas été mise en évidence *in vitro*. Depuis lors, cette activité a pu être mesurée dans des fractions d'endonucléase R.K purifiée, à laquelle elle est vraisemblablement associée (Heywood, 1972).Comme les autres activités modificatrices connues, elle est extrêmement faible, de l'ordre de 0,1 méthylation par molécule d'enzyme et par heure *in vitro* (Meselson, 1972). Ceci correspond à une activité spécifique de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-2} unités/mg dans les extraits bruts, c'est-à-dire de l'ordre du millième de la méthylation générale. Par conséquent, l'activité modificatrice, si elle existe, est négligeable en tant que facteur d'introduction de groupes méthyls sur l'ADN.

1 - 5 : CONCLUSION.

Les ADN méthyl transférases ont pu être purifiées environ 1500 fois et jusqu'à être dépourvues d'activité t-ARN méthylasique contaminante. Cette purification n'a été possible qu'à condition de mettre en jeu des étapes de fractionnement qui autorisent le maintien des enzymes dans des milieux de force ionique élevée (a contrario, c'est ainsi que l'activité est éluée de la DEAE-cellulose à PH 8 par NaCl 0,12 M avec un rendement de 6 %). Cette condition a pu être respectée grâce à l'emploi des gels d'alumine et d'hydroxyapatite, qui autorisent une concentration élevée en sels à anions monovalents. D'autre part, les dialyses ont été supprimées au profit de la filtration sur tamis moléculaire. Cependant, la condition de force ionique, nécessaire, n'est pas suffisante. Ainsi les enzymes sont élués du sulfoéthyl-Séphadex par le tampon Phosphate de K 0,5 M PH 6,5 sous forme d'agrégats lorsque l'étape hydroxyapatite a été omise.

La purification mise au point ne permet pas la séparation des activités Adénine-méthylase et Cytosine-méthylase. Toutefois, les cas où cette séparation a été obtenue permettent à l'expérimentateur d'envisager l'isolement de chacune des activités.

Les ADN méthyl-transférases sont présentes en quantité très réduite dans la cellule. Si l'on retient la valeur maximale de 1/30000ème pour la part pondérale qu'elles représentent dans les extraits bruts, et une masse moléculaire de 40000 (voir section 2), le nombre de molécules par cellule n'excède pas 50. Si d'autre part on fait l'hypothèse d'une activité similaire in vivo et in vitro, leur activité moléculaire spécifique serait de l'ordre de 0,2 soit une capacité de méthylation de 10 groupes méthyls par seconde et par bactérie. Cette valeur est peu différente de la vitesse de méthylation in vivo d'un chromosome se répliquant en 40 minutes (20 groupes méthyls par seconde).

1 - 6 : BIBLIOGRAPHIE :

ALBERTSSÖN, Per-Ake (1960) dans *"Partition of cell particles and macromolecules"* Almqvist et Wiksells Boktryckeria ab Uppsala.

BERNARDI G., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 423.

GOLD, M. et J. HURWITZ, (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3 858.

GOLD, M. et J. HURWITZ, (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3 866.

HABERMAN, A., HEYWOOD, J. et M. MESELSON, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3 138.

MARMUR, J., (1961) *J. Mol. Biol.*, 3, 208.

MESELSON, M., YUAN, R. et J. HEYWOOD, (1972) *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 447.

SCHLENK, F., ZYDEK, C.R., EHNINGER, D.J. et J.L. DAINKO, (1965) *Enzymologia*, 29, 283.

VISCHER, E., et E. CHARGAFF, (1948) *J. Biol. Chem.*, 176, 715.

WRIGHT, M., (1971) *J. Bacteriol.*, 107, 87.

ETUDE DE PROPRIETES DES ADN METHYL TRANSFERASES D'ESCHERICHIA COLI K_{12}

2 - 1 : PROPRIETES DE LA REACTION ENZYMATIQUE DES ADN METHYL TRANSFERASES.

2-1-1 : Optimums de PH et de force ionique.

2-1-2 : Détermination des K_m pour la S-Adénosyl méthionine.

2-1-3 : Inhibition des activités par des analogues de la S-Adénosyl méthionine.

2-1-3-1 : Inhibiteurs examinés et techniques.

2-1-2-2 : Sensibilité des enzymes aux composés examinés.

2-1-3-3 : Nature des inhibitions.

2-1-3-4 : Inhibition par la S-Adénosyl éthionine et par la S-Adénosyl homocystéine.

2-1-4 : Inhibition des activités par l'actinomycine D.

2 - 2 : INHIBITION DES ADN METHYL TRANSFERASES PAR UN INHIBITEUR LIPOPOLYSACCHARIDIQUE.

2-2-1 : Inhibition des activités par le lipopolysaccharide de Salmonella bredeney.

2-2-2 : Mise en évidence d'un inhibiteur dans les préparations d'ADN d'Escherichia coli B.

2 - 3 : INACTIVATION THERMIQUE DES ADN METHYL TRANSFERASES.

2-3-1 : Inactivation thermique de l'enzyme purifié.
(en anglais, tiré de *Eur. J. Biochem.*, 27, 53-59 (1972))

2-3-2 : Variations de l'énergie d'activation de dénaturation.

2 - 4 : SEDIMENTATION DES ADN METHYL TRANSFERASES DANS DES GRADIENTS DE SACCHAROSE.
(en anglais, tiré de *Eur. J. Biochem.*, 27, 53-59 (1972))

2 - 5 : DISCUSSION.

2 - 6 : BIBLIOGRAPHIE.

2 - 1 : PROPRIETES DE LA REACTION ENZYMATIQUE DES ADN METHYL TRANSFERASES.

2-1-1 : Optimums de PH et de force ionique :

L'effet des sels sur la vitesse initiale d'incorporation totale de groupes méthyls, avec la fraction SE comme source d'enzyme, est illustré par la figure 1. Pour les sels totalement dissociés, les optimums de concentration se situent entre 0,09 M et 0,16 M. Aucun des cations K^+, Na^+, NH_4^+, ni des anions Cl^-, $PO_4^{\equiv}$, $SO_4^{\equiv}$ n'a d'effet activateur spécifique. L'optimum de PH et la sensibilité à la force ionique de chacun des deux enzymes ont été déterminés en se servant d'un tampon composé de phosphate monopotassique, de Tris-base et de glycine dans les proportions 2/1/1 avec HCl variable. Ce mélange possède un pouvoir tampon quasi-constant dans la gamme de PH de 6 à 11. La figure 2 montre la variation de chacune des deux activités en fonction du PH, pour trois concentrations différentes du tampon. Cette figure fait ressortir trois éléments de comparaison entre les deux enzymes :

- A force ionique égale, les optimums de PH des deux enzymes sont égaux à 0,1 unité près.

- Lorsqu'augmente la force ionique, l'optimum de PH de chaque enzyme décroît par suite d'une inhibition très marquée des activités aux PH alcalins.

- Enfin, l'activité Cytosine-méthylase a un optimum de force ionique plus faible que l'activité Adénine-méthylase.

2-1-2 : Mesure des constances de Michaelis pour la S-adénosyl méthionine (=Ado-met).

Ces mesures, ainsi que celles faites dans la section suivante (2-1-3), sont effectuées en présence d'une concentration d'ADN égale à 500 µM (en résidus nucléotidiques). Nous avons vérifié que la vitesse d'incorporation ne varie pas pour des concentrations d'ADN supérieures à 100 µM, et nous supposerons que le système peut être considéré dans ces conditions comme binaire.

L'ADN accepteur utilisé est de Pseudomonas aeruginosa (variété internationale) et a été préparé par la méthode de Lehman (1960) suivie par un traitement avec la ribonucléase pancréatique et des déprotéinisations par la méthode de Sevag (1934).

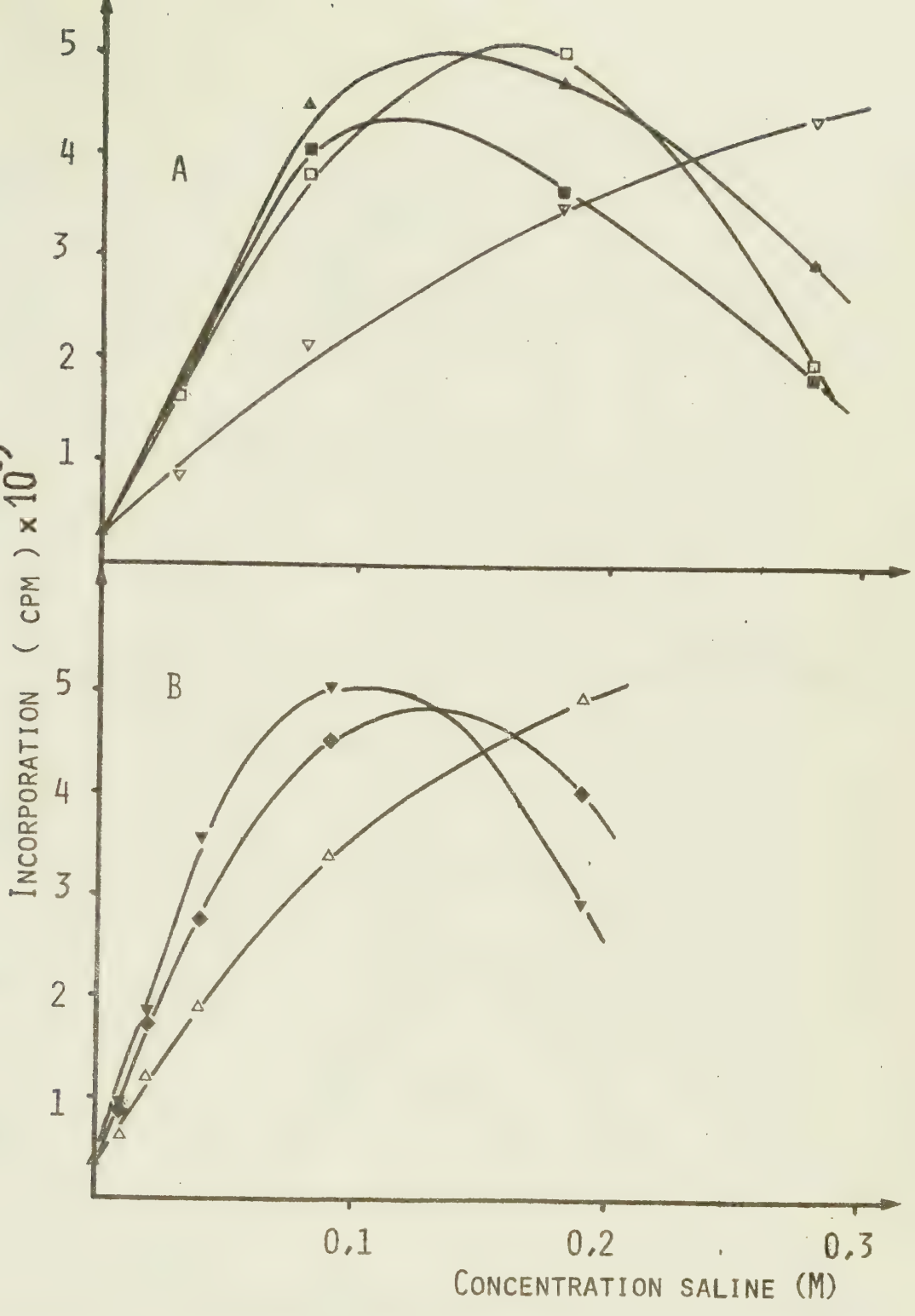


FIGURE 1 DEPENDANCE DE L'ACTIVITE DE LA FRACTION SE AVEC LA FORCE IONIQUE.

Incubation avec 8 unités de fraction SE, 30 minutes à 37° C

A : Tris-HCl 20 mM PH 8 + Tris-HCl PH 8 (▽); KCl (▲); NaCl (■); NH_4Cl (□)

B : Phosphate de K 10 mM PH 7,5 + KCl (△); K_2SO_4 (▼); Phosphate de K (◆)

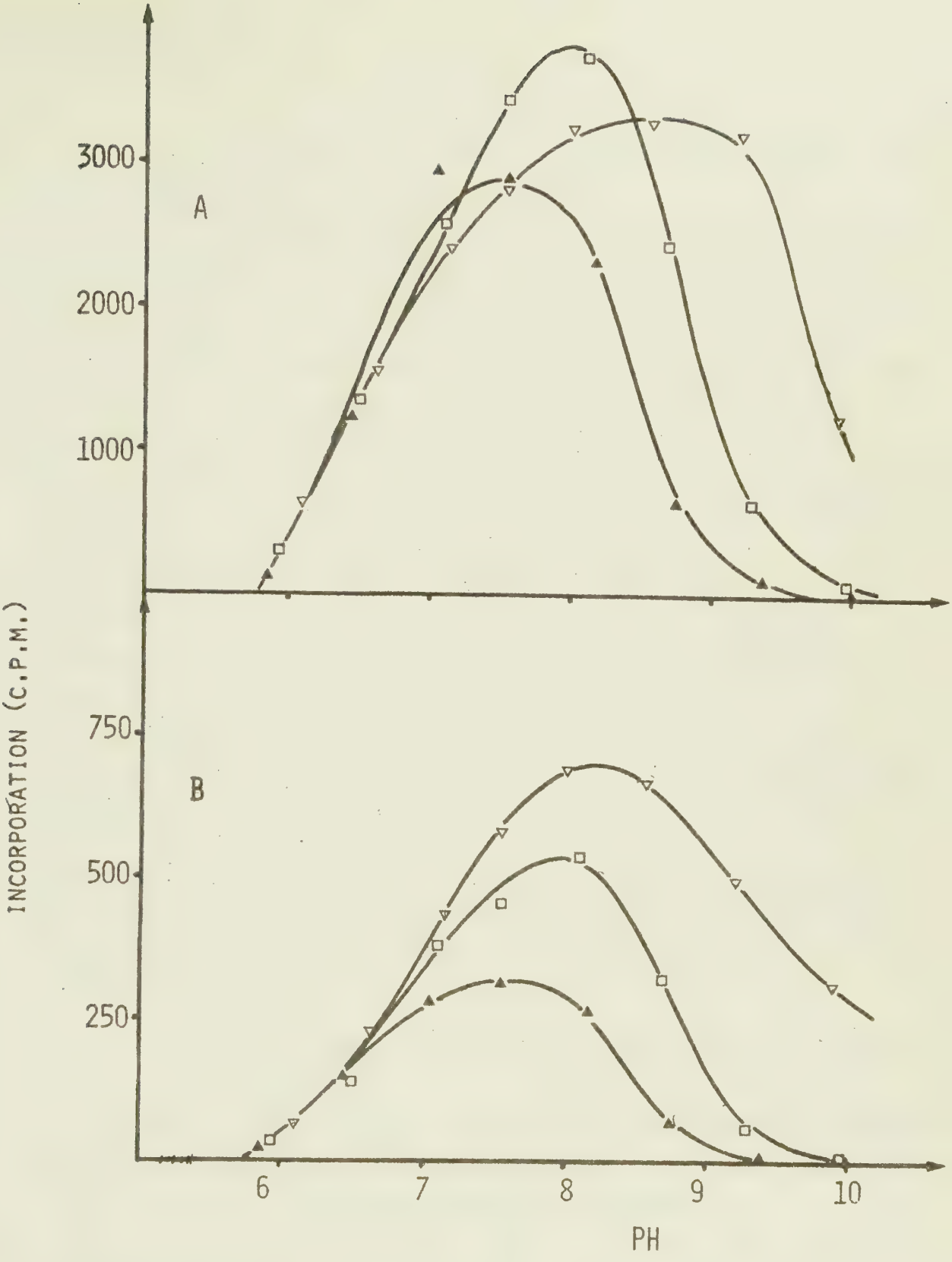


FIGURE 2 : DÉPENDANCE DE L'ACTIVITÉ DES ADÉNINE ET CYTOSINE MÉTHYLTRANSFÉRASES EN FONCTION DU PH.

Figure 2A : Activité adénine-méthylase; figure 2B : Activité cytosine-méthylase.

Pour mesurer les K_m vis-à-vis de la S-adénosyl méthionine, trois séries d'incubations sont faites en parallèle :

- Une série sans enzyme pour la mesure du bruit de fond résiduel à chaque concentration de Ado-met marquée.

- Une série avec l'enzyme (fraction SE) pour la mesure de l'incorporation totale.

- Une série double de la précédente pour la mesure du pourcentage de 5-méthylcytosine selon la technique décrite en 1-2-4.

Les figures 3A et 3B présentent le résultat de ces mesures. Sur la figure 3A, le pourcentage de cytosine méthylée est porté en fonction de la concentration de Ado-met. A partir de ce pourcentage, connaissant l'incorporation totale, on peut calculer les incorporations dans l'adénine et la cytosine dont les inverses sont portés en fonction de l'inverse de la concentration de Ado-met dans la figure 3B, selon la représentation de Lineweaver et Burk (1934). Les deux enzymes présentent des cinétiques de type michaelien, et les $K_{m\ (Ado-met)}$ sont respectivement 4×10^{-6} M et 8×10^{-6} M pour l'Adénine et la Cytosine-méthylase. Ces valeurs sont en bon accord avec le K_m global de 8×10^{-6} M mesuré auparavant avec de l'enzyme AS et de l'ADN de M. lysodeikticus comme substrat. Par contre elles diffèrent sensiblement de celles mesurées par Hurwitz et coll. (1964a). Il est intéressant de noter que les enzymes de modification exprimés chez E. coli dont les $K_{m\ (Ado-met)}$ sont connus ont des constantes très voisines de celles des méthylases générales : 4×10^{-6} M pour l'enzyme M.B (Kühnlein et Arber, 1972), 5×10^{-6} M pour l'enzyme M.P1 (Brockes, Brown et Murray, 1972).

2-1-3 : Inhibition des activités par des analogues de la S-adénosyl méthionine.

Comme pour la section précédente, l'ADN de Pseudomonas aeruginosa et la fraction enzymatique SE ont été utilisés.

2-1-3-1 : Inhibiteurs utilisés et techniques.

La liste des inhibiteurs examinés est portée sur le tableau I. L'adénosyl éthionine (= Ado-met, composé 10) a été préparé à partir de l'éthionine par incubation de levures de boulangerie selon la méthode de

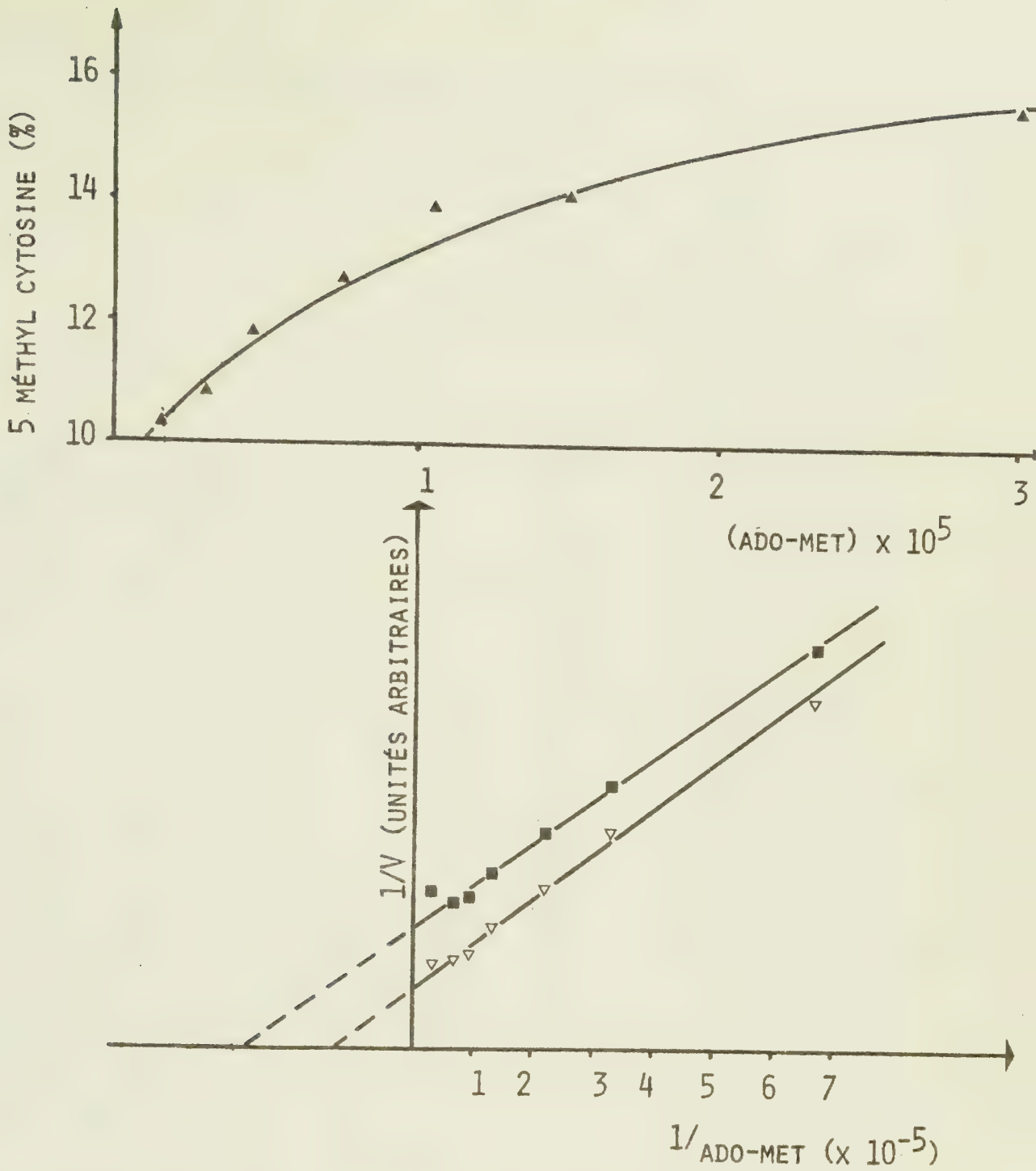
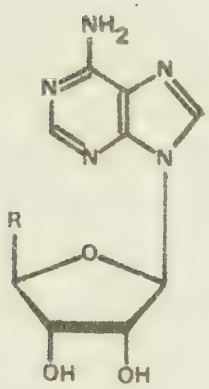


FIGURE 3 : DÉTERMINATION DES KM (ADO-MET) DES ADÉNINE ET CYTOSINE MÉTHYLASES

——— ■ ——— : Activité adénine-méthylase.

——— ▽ ——— : Activité cytosine-méthylase.

Tableau I : Analogues de la S - Adénosyl Méthionine.



(1) R = $-CH_2-S-CH_2-CHOH-CH_2OH$
5' S Dihydroxyéthyl Adénosine

(2) R = $-CH_2-S-CH_2-CH_2OH$
5' S Hydroxyéthyl Adénosine

(3) R = $-CH_2-O-CH_2-CH_2OH$
5' O Hydroxyéthyl Adénosine

(4) R = $-CH_2-S-CH_2-CH_2-COOH$
5' S Propionyl Adénosine

(5) R = $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CO-CH_3$
5' S Adénosyl N Acétyl Cystéamine

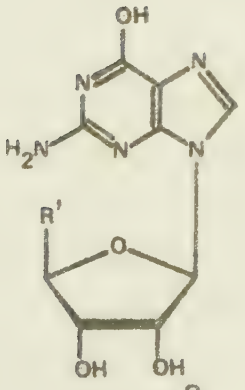
(6) R = $-CH_2-S-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$
5' S Butyl Adénosine

(7) R = $-CH_2-S-CH_2-CH\ (CH_3)_2$
5' S Isobutyl Adénosine

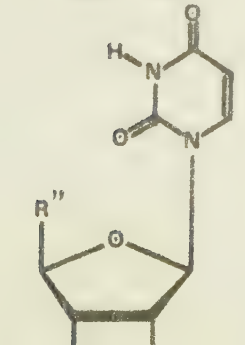
(8) R = $-CH_2-S-CH_2-CHNH_2-COOH$
5' S Adénosyl (L) Cystéine = Ado-Cys

(9) R = $-CH_2-S-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH$
5' S Adénosyl (DL) Homocystéine = Ado Homocy

(10) R = $-CH_2-\overset{+}{S}\ (CH_2-CH_3)-CH_2-CHNH_2-COOH$
5' S Adénosyl éthionine = Ado-Et



(11) R' = $CH_2-S-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH$
5' S Guanilyl (DL) Homocystéine



(12) R" = $CH_2-S-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH$
5' S Uridyl (DL) Homocystéine

Schlenk (1965). Tous les autres dérivés ont été préparés par voie chimique par M. Jean Hildesheim (Hildesheim et coll. 1971, Hildesheim et coll. 1972), qui m'a généreusement fourni quelques milligrammes de chacun d'eux.

Les inhibiteurs sont mis en solution à la concentration de 2×10^{-3} M pour les composés *L* ou sans isomère optique, et à la concentration de 4×10^{-3} M pour les racémiques. Dans ce dernier cas qui concerne les composés 9, 11 et 12, seule la concentration en forme *L* sera mentionnée. Les concentrations sont calculées d'après les valeurs des coefficients d'absorption molaire données dans la littérature. Pour les composés 1, 2 et 3, j'ai admis arbitrairement une valeur de ε_M (260 nm) égale à 15 000.

Pour déterminer commodément le taux d'inhibition de l'activité Cytosine méthylase par ces analogues, des doubles d'incubations sont traités pendant 15 heures à 30° C par l'acide formique à 66 % selon la méthode de Burton (1964). Après cela l'ADN est précipité par l'acide trichloracétique à 5 %, filtré et compté comme décrit en 1-2-3. Le pourcentage de radioactivité restant est en bon accord avec le pourcentage de 5-méthylcytosine déterminé par la méthode chromatographique, ainsi qu'il ressort du tableau II. Toutefois, si l'apurinisation de l'ADN, décrite par Burton, ne semble pas affectée par la présence des sels du milieu d'incubation, en revanche les fractions moins purifiées que la fraction SE conduisent à des résultats aberrants.

2-1-3-2 : Sensibilité des enzymes aux composés examinés.

Le tableau III montre les taux d'inhibition Cytosine-méthylase, cette dernière étant mesurée par différence. De ce tableau, il ressort que les composés 1, 2, 3, 4, 5, 11 et 12 n'inhibent pas ou très faiblement les méthyl-transférases à la concentration de 10^{-3} M. Les dérivés 6 et 7, c'est-à-dire -butyl et -isobutyl, ont un effet inhibiteur marqué sur la Cytosine-méthylase mais peu ou pas d'effet sur l'activité Adénine-méthylase (ils ne sont pas solubles au-delà de 10^{-3} M). Les composés 8, 9 et 10, c'est-à-dire Ado-cys, Ado-homocys et Ado-ét inhibent les deux enzymes.

Il est intéressant de comparer cette situation qualitative à

TABLEAU II : COMPARAISON DE LA METHODE CHROMATOGRAPHIQUE ET DE LA METHODE PAR APURINISATION POUR LA DETERMINATION DU TAUX DE CYTOSINE METHYLEE.

Conditions d'incubation :

50 mμM d'ADN de Pseudomonas aeruginosa,

0,6 μg de fraction SE (2,5 u),

Incubation de 33 minutes à 32°C.

Ado-met $\times 10^{-6}$ M	c. p. m. total	c. p. m. ADN apurinique	5-méthylcytosine	
			d'après apurinisation	d'après chromatographie
3	2828	325	11,5	12,6
30	4861	866	17,8	19,1

TABLEAU III : SENSIBILITE DES ADN METHYLASES A L'INHIBITION PAR DES ANALOGUES DE LA S-ADENOSYL METHIONINE

COMPOSE	CONC. (M)	INHIBITION (%) Adénine méthylase	Cytosine méthylase
(1) 5' S-dihydroxyéthyladénosine	10^{-3}	≤ 5	14
(2) 5' S-hydroxyéthyladénosine	10^{-3}	≤ 5	25
(3) 5' O- hydroxyéthyladénosine	10^{-3}	≤ 5	≤ 5
(4) 5' S-propionyladénosine	10^{-3}	≤ 5	≤ 5
(5) 5' S-adénosyl N-acétylcystéamine	10^{-3}	≤ 5	10
(6) 5' S-butyladénosine	10^{-4}	≤ 5	10
	10^{-3}	15	44
(7) 5' S-isobutyladénosine	10^{-4}	≤ 5	17
	10^{-3}	10	75
(8) Ado-cys	10^{-4}	13	20
	10^{-3}	57	42
(9) Ado-homocys	2×10^{-5}	43	100
	10^{-4}	68	100
	10^{-3}	89	100
(10) Ado-ét	10^{-4}	62	79
	7×10^{-4}	87	100
(11) 5' S-guanosylhomocystéine	10^{-3}	≤ 5	7
(12) 5' S-uridylhomocystéine	10^{-3}	≤ 5	≤ 5

celle rencontrée chez la t-ARN guanine méthyl-transférase et les protéines méthylases du foie de rat, étudiés par J. et R. Hildesheim, E. Lederer et J. Yon (1972). Parmi les composés non inhibiteurs, les dérivés 2, 5 et 11 ont été étudiés par Hildesheim et coll.. A des concentrations équivalentes à celles qui figurent au tableau III, ils se comportent en inhibiteurs faibles : De 15 à 40 % pour la guanine-méthylase, de 20 à 50 % pour les protéines méthylases. Ceci indique que le remplacement de la base purique, l'introduction d'un groupe N-acétyl terminal ou la suppression du groupe aminé terminal, qui conduisent à des composés encore faiblement inhibiteurs pour ces enzymes, a un effet plus marqué dans le cas des ADN méthylases. L'absence d'inhibition par les composés 1, 3, 4 et 12 confirme l'exigence des groupes amino-6 de la base burique et amino terminal de la chaîne en 5' du ribose, déjà établie par Zappia et coll. (1969) pour plusieurs enzymes de transméthylation.

Cependant, la classe des dérivés aliphatiques -butyl et -isobutyl échappe à cette règle dans le cas de la Cytosine-méthylase, comme cela a été observé pour les méthylases des protéines du foie de rat. Dans ces deux cas, le dérivé -isobutyl est le meilleur des deux inhibiteurs.

Enfin les composés Ado-cys et Ado-homocys sont aussi de bons inhibiteurs des guanine et protéine-méthylases du foie de rat.

2-1-3-3 : Nature des inhibitions.

Le mécanisme exact des inhibitions n'a pas été étudié pour tous les composés actifs. Cependant le type d'inhibition a été examiné en comparant les taux d'inhibition pour deux concentrations d'Ado-met : 3×10^{-6} M et 3×10^{-5} M. Les résultats sont indiqués sur le tableau IV. Ce tableau montre que l'inhibition par les dérivés -butyl et -isobutyl est vraisemblablement de type non compétitive, alors que les dérivés Ado-homocys, Ado-et et Ado-cys inhibent les méthylases de manière compétitive.

2-1-3-4 : Inhibition par la S-adénosyl homocystéine et par la S-adénosyléthionine.

Les deux analogues qui exercent l'inhibition la plus marquée des enzymes, Ado-homocys et Ado-ét ont été examinés de manière plus détaillée. La figure 4A montre la variation de l'inverse des activités Adénine

TABLEAU IV : VARIATION DES TAUX D'INHIBITION DES ADN METHYLASES PAR DES ANALOGUES DE ADO-MET SUIVANT LA CONCENTRATION D'ADO-MET.

INHIBITEUR		INHIBITION (%)			
		Ado-Met = 3×10^{-6} M		Ado-Met = 3×10^{-5} M	
Nature	Concentration	A.	C.	A.	C.
Ado-Homocys	2×10^{-4}	63		26	
	2×10^{-5}		79		56
Ado-Et	$7,2 \times 10^{-5}$	75	75	45	34
Ado-Cys	10^{-3}	63	64	24	42
Ado-Butyl	10^{-3}	≤5	56	≤5	48
Ado-Isobutyl	10^{-3}	≤5	62	≤5	62

et Cytosine-méthylase en fonction de la concentration d'inhibiteur. L'activité Adénine-méthylase est inhibée de manière identique par les deux analogues alors que l'activité Cytosine-méthylase est beaucoup plus sensible à l'inhibition par le produit que par Ado-met. A partir de la figure 4A on peut calculer le terme $K_i \ (1 + \frac{S}{Km})$ et en déduire K_i.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus.

K_i	Adénine méthylase	Cytosine méthylase
Ado -homocys	$1,1 \times 10^{-5}$ M	9×10^{-7} M
Ado -ét	$1,1 \times 10^{-5}$ M	$1,4 \times 10^{-5}$ M

Le K_i pour l'inhibition de l'activité Cytosine-méthylase par l'Ado-homocys a été déterminé indépendamment par la mesure de $1/V = f\ (1/S)$ avec ou sans inhibiteur. Cette mesure, représentée sur la figure 4B, confirme la mesure du K_m faite précédemment, le caractère compétitif de l'inhibition, et conduit à un K_i égal à 8×10^{-7} M.

L'affinité exceptionnellement grande de l'Ado-homocys pour la Cytosine méthylase, que l'on ne retrouve pas pour l'Adénine-méthylase, peut avoir deux origines, séparément ou ensemble. On peut supposer soit un empêchement stérique dans le cas de l'Ado-ét par le groupe éthyl, soit une facilitation de la fixation à l'enzyme due à la disparition de la charge sulfonium. En l'absence de composés sulfonium porteurs de groupements plus encombrants (isopropyl, phényl,...), il n'est pas possible de trancher entre ces deux hypothèses.

2-1-4 : Inhibition des activités par l'actinomycine D :

L'actinomycine D inhibe quantitativement la réaction de méthylation de l'ADN de M. lysodeikticus (figure 6). Il était intéressant de savoir si l'interaction de l'actinomycine avec l'ADN, connue pour s'effectuer préférentiellement au niveau des résidus guanyliques (Kerstein, 1961 - Kahan, 1963), affectait plus l'une ou l'autre des activités. La figure 6 montre qu'il n'y pas d'inhibition préférentielle de l'Adénine méthylase.

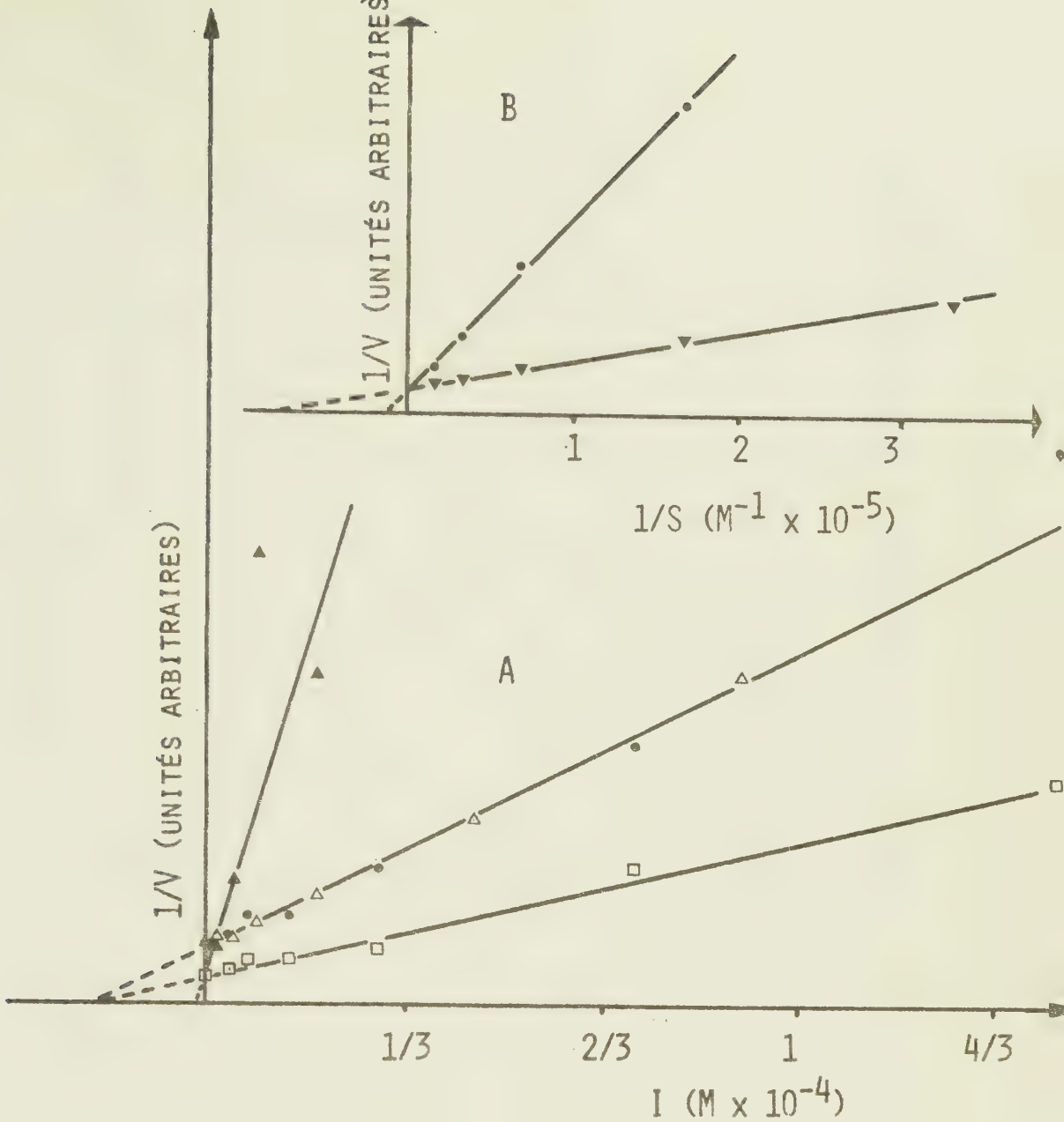


FIGURE 4 : INHIBITION DES ADÉNINE ET CYTOSINE MÉTHYLASES PAR ADO-HOMOCYS ET ADO-ET.

A : Courbe 1/V = f (I).
Inhibition de l'adénine-méthylase par Ado-homocys (△) et par Ado-et(●)
Inhibition de la cytosine-méthylase par Ado-homocys(▲) et par Ado-et(□).

B : Courbe 1/V = f (1/S). Inhibition de la cytosine-méthylase par Ado-homocys. ▼ : I = 0 ; ● : I = 10^{-6} M.

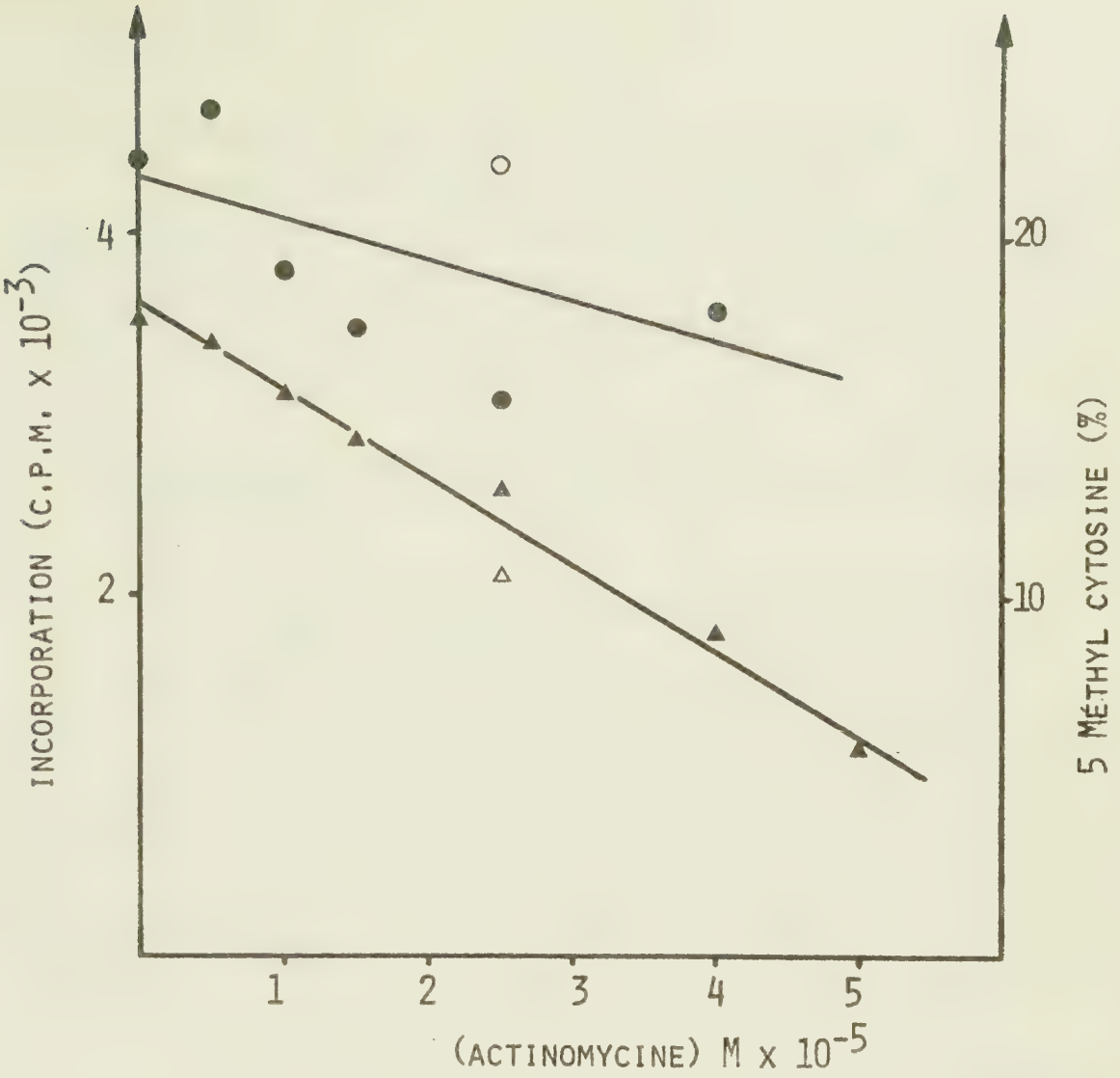


FIGURE 6 : INHIBITION DES ADÉNINE ET CYTOSINE MÉTHYLASES PAR L'ACTINOMYCINE D.

L'ADN de M. lysodeikticus est préincubé dans le tampon Phosphate-tris-glycine 0,15 M PH 8 (voir section 2-2-1) pendant 15 minutes à 25° C avec des quantités variables d'actinomycine D et en présence d'Ado-met. Ensuite 6,4 unités d'enzyme (fraction SE) sont ajoutés et la réaction est arrêtée au bout de 30 minutes d'incubation à 37° C.

▲ : Incorporation totale; ● : Pourcentage de 5-méthyl cytosine mesuré sur des duplicats. Pour la mesure marquée △ (incorporation totale) et ○ (pourcentage), la préincubation est poursuivie pendant 15 minutes à 0° C après les 15 minutes à 25° C.

Ceci est contraire à l'observation faite par Hurwitz (1964b).

La concentration d'actinomycine pour laquelle la réaction est inhibée à 50 %, soit 4×10^{-5} M, correspond à la liaison de l'actinomycine avec 72 % des sites présents sur l'ADN, si l'on admet un nombre de nucléotides par sites égal à 10 et une constante d'affinité de 2×10^{-6} M^{-1} (Gellert et coll., 1965 ; Wells, 1971).

2 - 2 : INHIBITION DES ADN METHYL TRANSFERASES PAR UN INHIBITEUR LIPOPOLYSACCHARIDIQUE.

2-2-1 : Inhibition des activités par le lipopolysaccharide de Salmonella bredeney.

Falashi et Kornberg (1965) avaient observé que l'ADN méthylase induite lors de l'infection par le bactériophage T2 est puissamment inhibée par le lipopolysaccharide des bactéries Gram$^-$. Cette inhibition résulte de l'association directe du lipopolysaccharide (= LPS) avec l'enzyme. La possibilité que le LPS joue un rôle régulateur de la méthylation de l'ADN a été suggérée par le fait que le bactériophage filamenteux M 13 est naturellement associé à cet inhibiteur, qu'il solubilise et détache de la paroi bactérienne lors de la lyse.

Il était donc intéressant de savoir si cet effet "protecteur" du LPS pouvait aussi s'exercer envers les méthylases normalement présentes dans la cellule.

A cette fin, le LPS de Salmonella bredeney 27* purifié, aimablement fourni par M^{elle} Anne-Marie Staub, a été utilisé. Il est gardé en suspension dans l'eau distillée et ajouté à des doses variables juste avant l'incubation.

La figure 7 montre l'effet de quantités variables de LPS sur l'activité totale d'une fraction SE et d'une fraction AS (semi-purifiée). Alors que quelques microgrammes de LPS inhibent l'activité de l'enzyme purifié, l'inhibition de la fraction AS est très réduite ou nulle avec 20 µg de LPS. Cette situation est semblable à celle de l'inhibiteur décrit par Falashi et Kornberg, inactif sur les extraits bruts de bactéries infectées par le bactériophage T2.

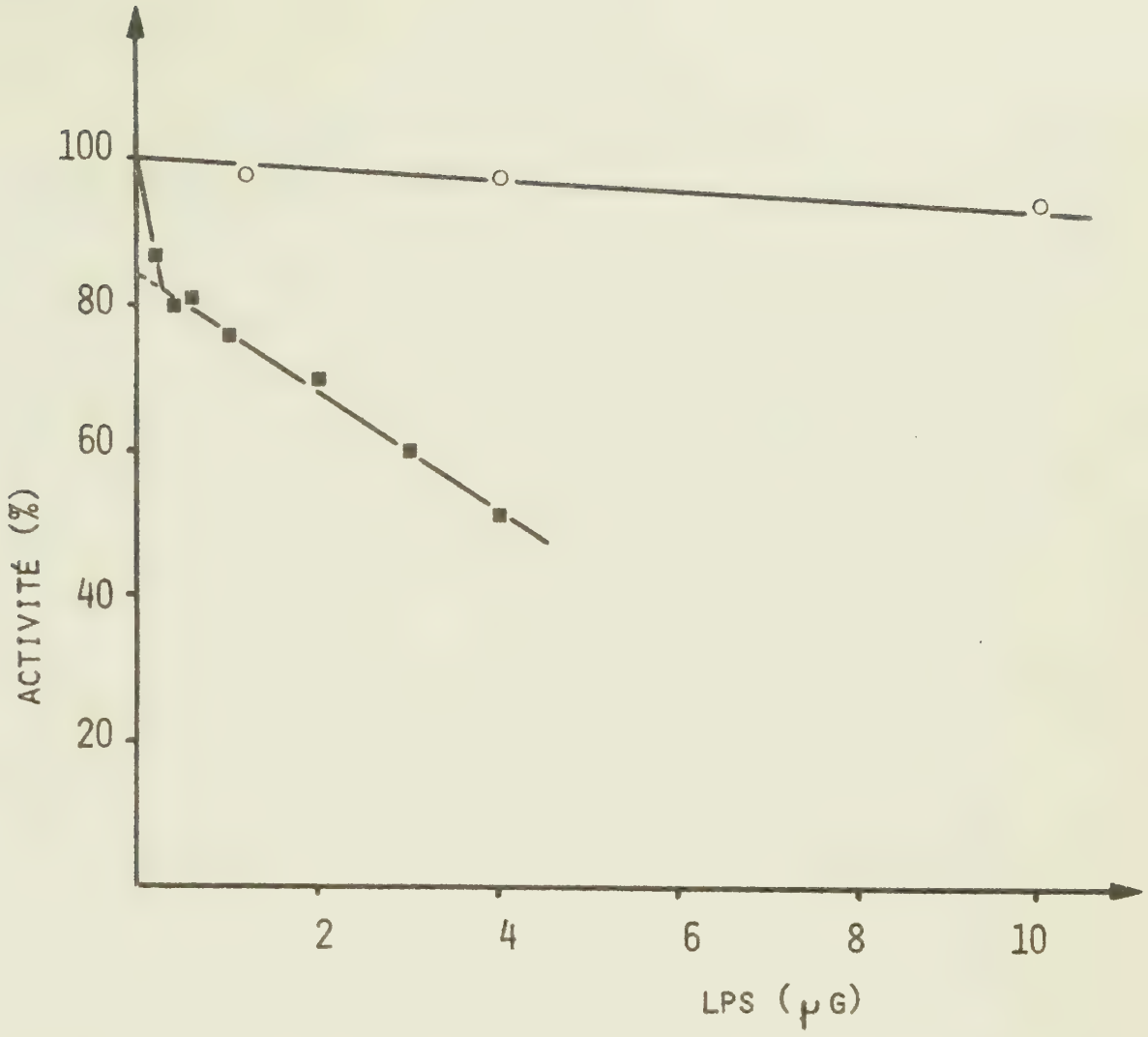


FIGURE 7 : INHIBITION DE L'ACTIVITÉ MÉTHYLASIQUE PAR LE LIPOPOLYSACCHARIDE DE S. BREDENEY.

Courbe supérieure (○) : Inhibition de l'activité d'une fraction AS. Incubation avec 6,4 unités de fraction AS à 170 u/mg de protéines pendant 40 minutes à 37° C avec l'ADN de M. lysodeikticus comme substrat.

Courbe inférieure (●) : Inhibition de l'activité d'une fraction SE. Incubation avec 3,8 unités de fraction SE à 10700 u/mg de protéines pendant 30 minutes à 37° C avec l'ADN de M. lysodeikticus comme substrat.

L'anti-inhibiteur présent dans les fractions AS n'est perdu que progressivement quand on augmente la température de chauffage de ces fractions. Ceci peut être mis en évidence en mesurant la disparition de l'effet protecteur des fractions AS sur l'enzyme purifié, en présence d'un excès de LPS, en fonction de la température de chauffage de ces fractions (figure 8). Ceci permet de conclure que l'antiinhibiteur n'est vraisemblablement pas une espèce protéique unique, mais un mélange complexe. Le fait que la spermine, à des doses de quelques µg/ml, lève l'inhibition exercée par le LPS sur l'enzyme purifié, tend à attribuer aux protéines basiques l'effet anti-inhibiteur des fractions peu purifiées.

L'analyse des effets du LPS de S. bredeney sur les activités Adénine et Cytosine-méthylase révèle une situation complexe. Alors que l'activité Adénine-méthylase est toujours inhibée par le LPS, et que cette inhibition est levée par l'addition de 10^{-2} M magnésium dans le milieu d'incubation, l'activité Cytosine-méthylase est soit inhibée, soit activée (jusqu'à 60 %) pour de très faibles quantités de LPS (de l'ordre de 1 µg par unité d'activité Cytosine-méthylase). Pour de plus fortes quantités de LPS, on observe une inhibition. Les changements observés aux faibles concentrations de LPS n'ont pu être corellées à aucun facteur tel que vieillissement des solutions d'inhibiteur, PH ou force ionique.

Cette situation est illustrée par la figure 9, où est portée la variation du taux d'activité Adénine et Cytosine-méthylase, et le pourcentage de 5-méthylcytosine incorporée, en fonction de la quantité de LPS ajouté.

2-2-2 : Mise en évidence d'un inhibiteur dans les préparations d'ADN de Escherichia coli B.

Escherichia coli B diffère des souches K_{12}, à l'égard de la méthylation générale, par l'absence de la Cytosine-méthylase (Hurwitz, 1962 ; Borek, 1965). L'ADN d'E. coli B doit donc être un accepteur spécifique pour la Cytosine-méthylase d'E. coli K_{12}. Lors de l'examen

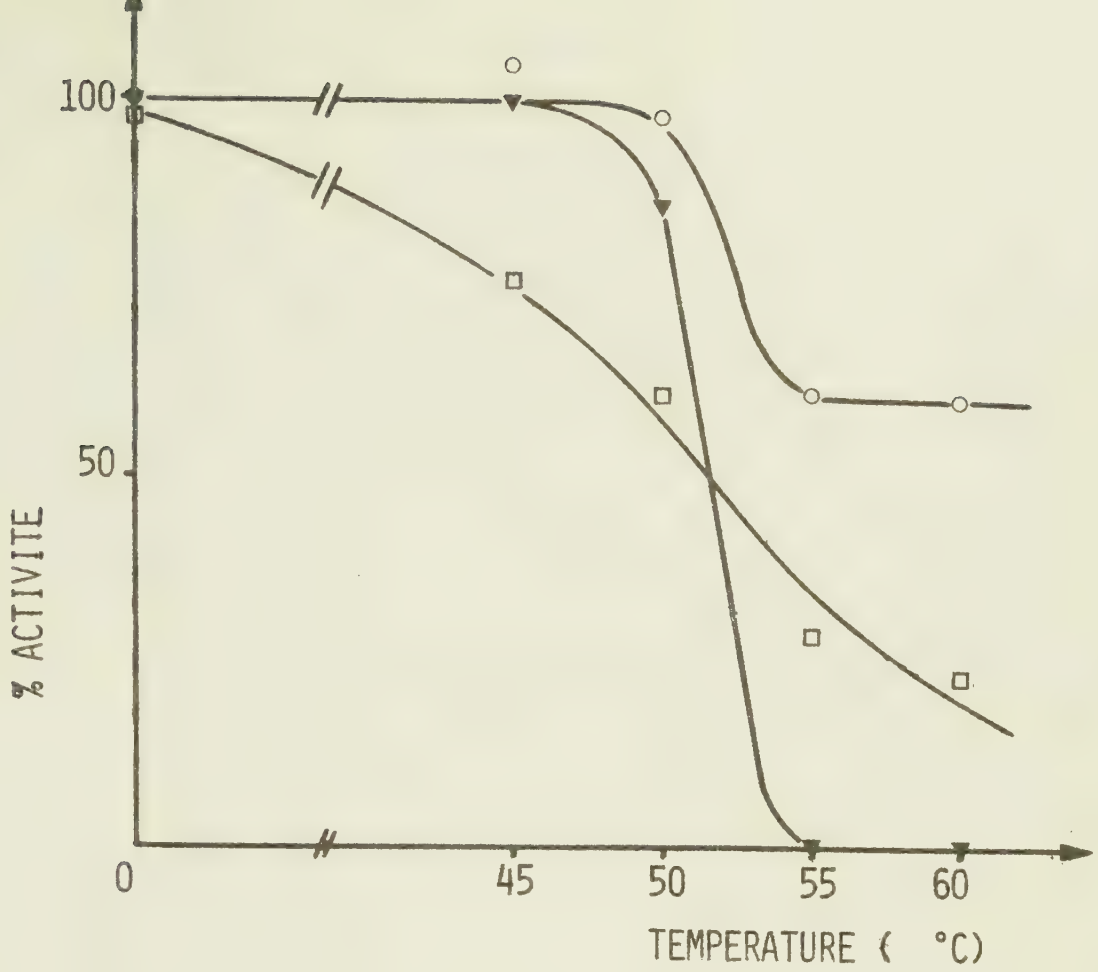


FIGURE 8 : VARIATION DE L'EFFET ANTI-INHIBITEUR (ANTI-LPS) EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE DES FRACTIONS SEMI PURIFIÉES.

—— ▼ —— : 3,2 unités de fraction AS (18 µg) sont portés pendant 10 min. à diverses températures, puis incubés durant 30 minutes à 37° C dans le test standard.

—— ○ —— : Comme précédemment, excepté que 3,8 unités de fraction SE sont ajoutés avant l'incubation à 37° C.

—— □ —— : En plus des 3,8 unités de fraction SE, 10 µg de LPS sont ajoutés juste avant l'incubation à 37° C. La courbe —— □ —— représente le rapport entre l'incorporation obtenue dans ces conditions et celle obtenue sans LPS.

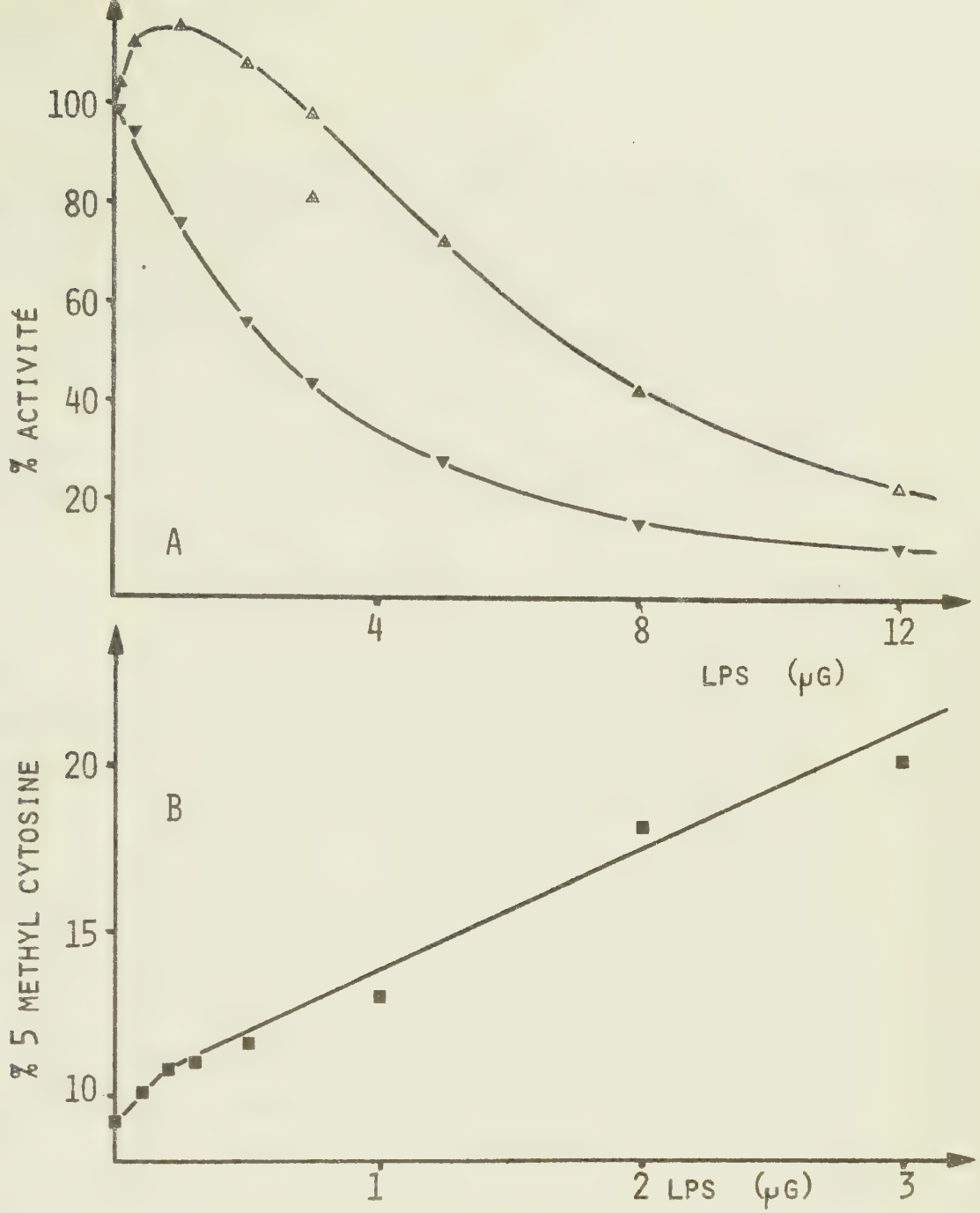


FIGURE 9 : VARIATION DES ACTIVITES ADENINE ET CYTOSINE METHYLASE EN FONCTION DE LA QUANTITE DE LIPOPOLYSACCHARIDE DE S. BREDENEY.

A : Variation des activités adénine- (▼) et cytosine- (▽) méthylases. Dosage : 3,2 unités, 1 heure à 37° C. L'activité cytosine-méthylase est mesurée après apurinisation de l'ADN (voir section 2-1-3-1).

B : Variation du pourcentage d'activité cytosine (■) mesuré par la méthode chromatographique (section 1-2-4). Le tracé continu est déduit de la figure 9A par le calcul.

de diverses préparations d'ADN d'E. coli B effectués par la méthode de Marmur, certaines se révélèrent réfractaires à la méthylation par l'enzyme purifié (fraction SE). L'une de ces préparations, appelée DNA B_{3-58}, a été utilisée pour l'isolement de l'inhibiteur.

Le tableau suivant résume les propriétés de l'inhibiteur présent dans la préparation DNA B_{3-58} :

Conditions : Test standard avec 100 nM d'ADN de E. coli B et 1 µl (12 u) de fraction SE, Incubation de 1 heure à 37° C.

CONDITIONS PARTICULIERES	INCORPORATION c. p. m.
ADN B_{5-11}	512
ADN B_3-58	7
ADN B_{3-58} + $MgCl_2$ à 10^{-2} M	0
ADN B_{3-58} + 4 µl de fraction AS inactivée à 45° C pendant 10 minutes.....	710
ADN B_{3-58} + 4 µl de fraction AS inactivée à 65° C pendant 10 minutes.....	600
ADN B_{3-58} + 4 µl de fraction AS inactivée à 90° C pendant 10 minutes.....	470
ADN B_{3-58} soniqué pendant 30" (désintégrateur MSE, microsonde, amplitude 8 µm).....	0
ADN B_{3-58} soniqué pendant 30" puis centrifugé pendant 30 minutes à 300 000 g.....	700
ADN B_{3-58} purifié sur colonne d'hydroxyapatite en présence de KCl 3 M.....	760

Ce tableau montre que l'inhibiteur est sensible à l'effet des protéines présentes dans les fractions d'enzyme semi-purifié, et est séparé de l'ADN par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite et par centrifugation différentielle. L'inhibiteur a été purifié par chromatographie sur colonne de Biogel P 300, après traitement de l'ADN par la DNase pancréatique à 100 µg/ml en présence de Mg^{++} à 10^{-2} M.

Le matériel élué au volume d'exclusion et concentré a les densités optiques suivantes : 77 x 10^{-3} à 280 nm et 82 x 10^{-3} à 260 nm.

La figure 10 montre l'effet de l'inhibiteur isolé sur l'incorporation de groupes méthyl dans l'ADN de micrococcus. La courbe d'inhibition est très voisine de celle observée avec le LPS de S. bredeney (figure 7). Une inhibition de moitié est obtenue pour une quantité équivalente à 1,04 x 10^{-3} DO à 280 nm et 1,1 x 10^{-3} DO à 260 nm. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues avec le LPS de S. bredeney 27^{+} dans des conditions de dosage identiques : 1,94 x 10^{-3} DO et 2,54 x 10^{-3} DO respectivement à 280 et 260 nm. La faible différence observée est d'ailleurs explicable par des traces d'acides nucléiques contaminants, le LPS pur n'ayant pas de pic d'absorption dans l'ultraviolet proche.

L'inhibiteur de E. coli B est insensible à l'attaque par le périodate et à l'effet du magnésium, mais 1 µg de spermine lève à 50 % l'inhibition exercée par 20 µl d'inhibiteur purifié.

Le tableau ci-dessous résume les propriétés de l'inhibiteur de E. coli B et du LPS de S. bredeney. Les propriétés du LPS de S. typhimurium envers l'ADN méthylase du bactériophage T2 sont indiquées en comparaison.

PROPRIETE	LPS de S. bredeney		Inh. de E. coli B		LPS de S. typhimurium
	A.	C.	A.	C.	T2
Inhibition	+	±	+	+	+
Anti-inhibition des fractions AS	+	NT	+	+	+ (extrait brut)
Effet de la spermine	+	NT	+	NT	+
Effet du magnésium	+	-	-	-	+
Effet du traitement périodique≠	NT	NT		-	+

≠ : Essais effectués en l'absence de contrôle positif.

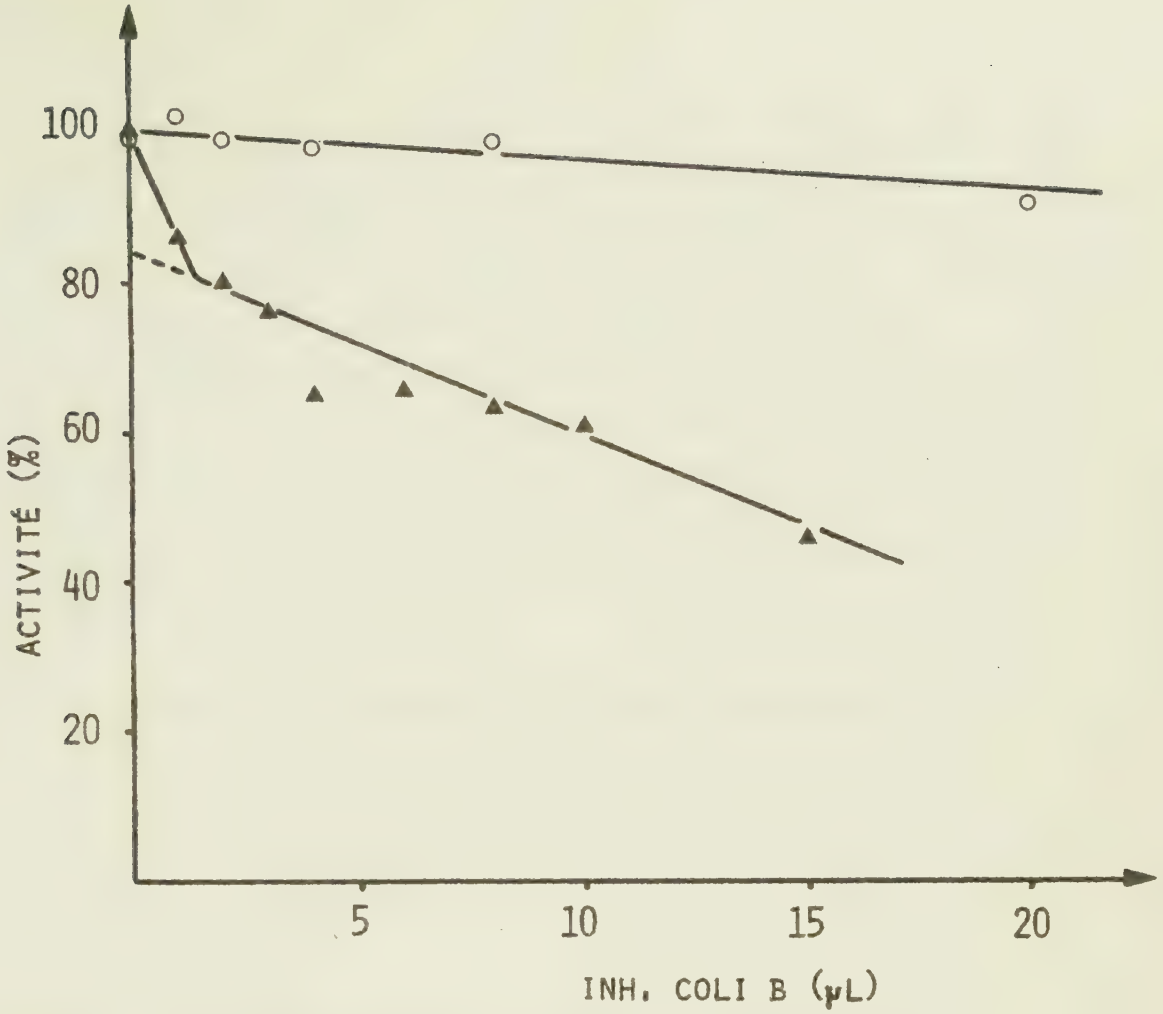


FIGURE 10 : INHIBITION DE L'ACTIVITE METHYLASIQUE PAR L'INHIBITEUR PURIFIE D'ESCHERICHIA COLI B.

Courbe supérieure (○) : Inhibition de l'activité d'une fraction AS. Incubation avec 6,4 unités de fraction AS à 170 u/mg de protéines pendant 40 minutes à 37° C avec l'ADN de M. lysodeikticus comme substrat.

Courbe inférieure (▲) : Inhibition de l'activité d'une fraction SE. Incugation avec 3,8 unités de fraction SE à 10700 u/mg de protéines pendant 60 minutes à 37° C avec l'ADN de M. lysodeikticus comme substrat.

L'inhibiteur présent dans certaines préparations d'Escherichia coli B s'identifie au lipopolysaccharide des bactéries Gram⁻ par trois critères : Coefficient de sédimentation supérieur à 50 S (Westphal, 1965), absence de pic d'absorption dans l'ultraviolet proche (Romanowska, 1970) et capacité d'inhibition des ADN méthylases d'Escherichia coli K_{12}.

Toutefois, le site actif de l'inhibition pourraît n'être pas le même que pour l'ADN méthylase du bactériophage T2. En effet, l'inhibiteur de E. coli B, que j'ai le plus étudié à cet égard, s'est montré insensible à l'effet du magnésium at de l'acide périodique (qui détruit le cétodésoxyoctonate du "core" central du LPS), contrairement aux résultats obtenus par Falashi et Kornberg.

2 - 3 : INACTIVATION THERMIQUE DES ADN METHYL TRANSFERASES.

2-3-1 : Inactivation thermique de l'enzyme purifié.

(en anglais, tiré de *Eur. J. Biochem.*, 27, 53-59 (1972))

voir page 50.

Fig. 2 shows the thermal inactivation of an alumina fraction (see Materials and Methods) in two conditions of ionic strength and concentration. The enzyme is inactivated in two steps. Each one corresponds to the inactivation of one kind of activity.

When enzyme from the final fraction was heated for 10 min at various temperatures a residual-activity curve showed two distinct sharp inactivation phases, each one corresponding to the loss of one type of activity (Fig. 3).

Such curves allow for the determination of the temperatures for which the half life of each activity is 10 min (T_{10}).

Fig. 4 A shows the variations of T_{10} as a function of the initial enzymatic concentration when heating was performed in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.0 in the presence of 400 μg/ml bovine serum albumin. T_{10} variations of both activities are identical and of limited extent.

In the next experiment T_{10} of each activity was measured at various saline concentrations, the initial enzyme concentration being kept equal to 1600 U/ml. Results shown in Fig. 4 B indicate that T_{10} is quite invariant for cytosine methylating activity while a 22 °C variation is observed for adenine methylating activity.

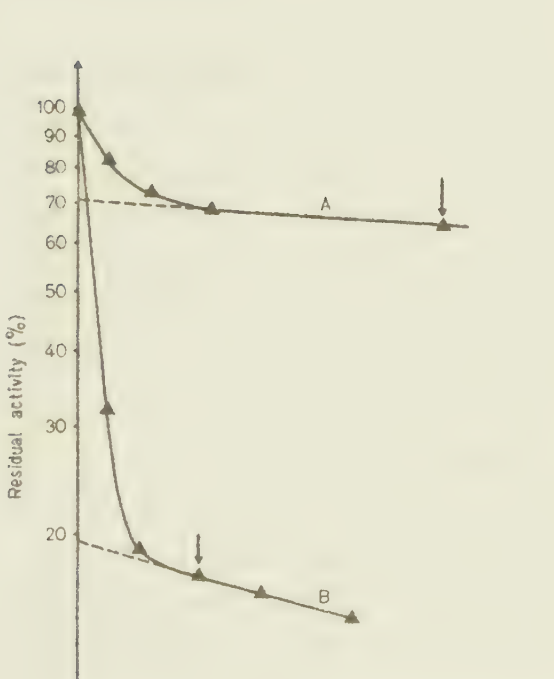


Fig. 2. *Thermo-inactivation of an alumina fraction containing 70.5% adenine methylase activity before heating (A) at 42 °C and (B) diluted and heated at 37 °C.* (A) Initial concentration: 4300 U/ml in 10 mM Tris buffer pH 8, 1 mM $(NH_4)_2SO$ 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA. At the time indicated by the arrow a duplicate was kept which contained 95% adenine methylating activity. (B) The same initial sample was diluted ten-fold in 100 mM Tris buffer pH 8, 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA and then it was denatured at 37 °C. At the time indicated by an arrow a duplicate was

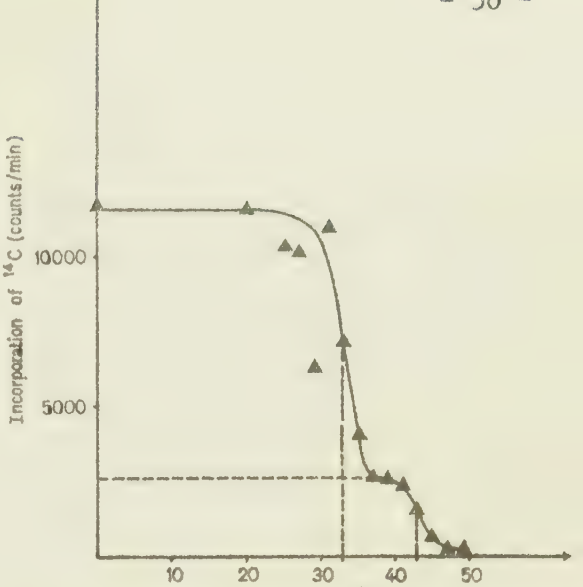
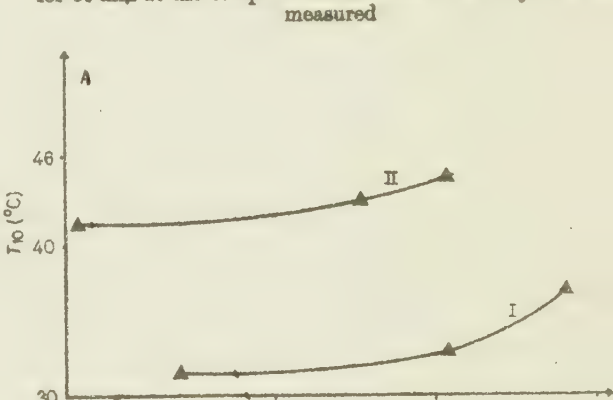


Fig. 3. *Inactivation of the final fraction.* Enzyme (1600 U/m in 0.1 M phosphate buffer pH 7 + 0.4 mg/ml bovine serum albumin containing 50 mM 2-mercaptoethanol was denature for 10 min at the temperatures indicated. Activity was the measured



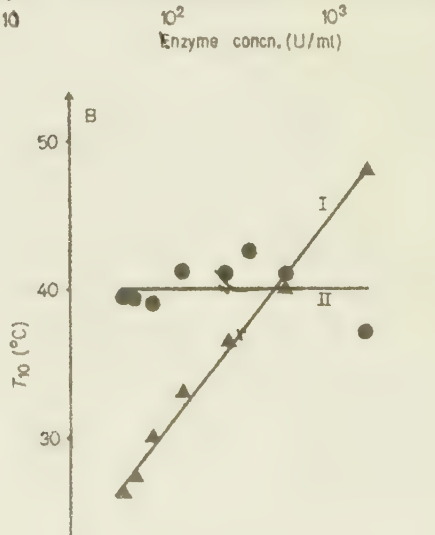


Fig. 4. *Variation of* T_{10} *as a function of (A) enzyme concentration of each activity and (B) the square root of the ionic strength* The medium for (A) was the same as in Fig. 3. The mediu for (B) contained 10 mM phosphate buffer pH 7, 0.4 mg/m bovine serum albumin, 50 mM 2-mercaptoethanol and var ous amounts of NaCl. Initial total enzyme concentration wa

2-3-2 : Variations de l'énergie d'activation de dénaturation :

Il est possible, à partir des courbes du type de celle portée en figure 3 (2-3-1) de calculer l'énergie d'activation expérimentale d'après l'équation $\frac{\partial (\ln k)}{\partial (1/T)} = \frac{-E}{R}$. Ceci suppose que la réaction est d'ordre 1, ce que j'ai toujours observé quelle que soit la concentration et la force ionique. La mesure de l'énergie d'activation n'est pas précise en raison de la méthode utilisée. Aussi faut-il considérer les courbes $E = f(\ln C)$ et $E = f(\sqrt{\mu})$ comme des sources de renseignements plus qualitatifs que quantitatifs.

En fonction de la concentration enzymatique initiale, on observe une variation très considérable de l'énergie d'activation des enzymes (figure 11 A). Cette variation peut exprimer l'existence d'une structure oligomérique des enzymes. Toutefois, il faut se souvenir que les enzymes étudiés ne sont pas purs.

En fonction de la force ionique, l'énergie d'activation de la cytosine méthylase varie peu, alors que celle de l'adénine-méthylase diminue fortement aux basses forces ioniques (figure 11 B). Ainsi l'abaissement de force ionique exerce des effets par diminution de deux grandeurs : La température de demi-transition 10 minutes (T_{10}) et l'énergie d'activation E. Ces deux effets suivent des relations du type $y = a\sqrt{\mu} + b$ (ceci est particulièrement net au vu de la figure 4, § 2-3-1). Le fait que l'effet de la force ionique exerce un effet suivant la loi de Debye simplifiée montre que nous avons affaire à un effet de sel primaire.

Il n'y a pas, a priori, de relation entre T_{10} et E. Or dans le cas de l'adénine méthylase, un abaissement de T_{10} conduit à un abaissement de E. Ceci montre que les liaisons hydrophobes prédominent dans la molécule, car contrairement aux liaisons hydrogène, elles sont moins stables à basse température (Kauzmann, 1954).

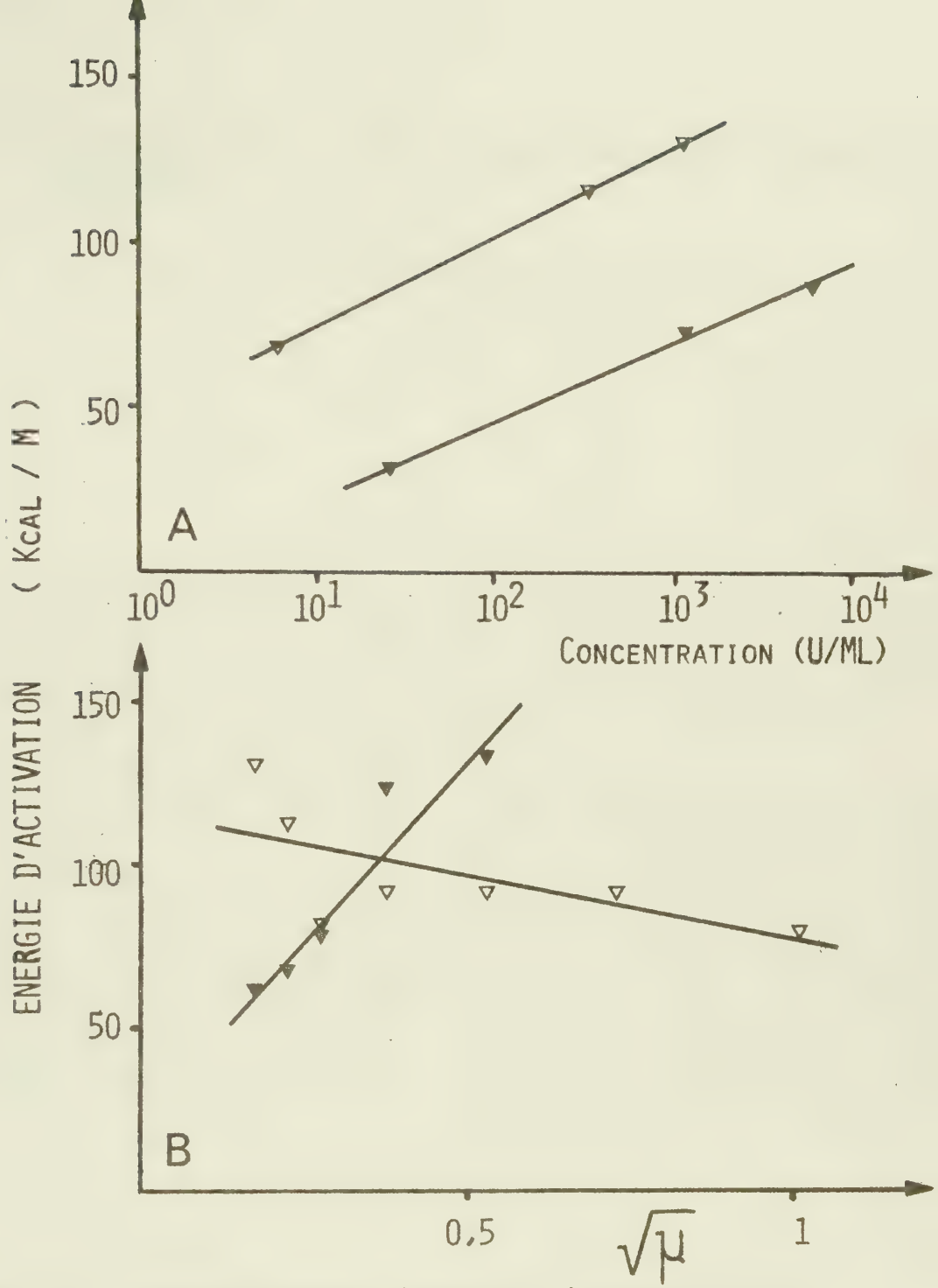


FIGURE 11 VARIATIONS DE L'ENERGIE D'ACTIVATION DE DENATURATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE ET DE LA RACINE CARREE DE LA FORCE IONIQUE

(Voir les explications dans le texte)

▼ : Inactivation de l'adénine méthylase

▽ : Inactivation de la cytosine méthylase

2 - 4 : SEDIMENTATION DES ADN METHYL TRANSFERASES DANS DES GRADIENTS DE SACCHAROSE.

(en anglais, tiré de *Eur. J. Biochem.*, 27, 53-59 (1972)) .

Sedimentation Properties in Sucrose Gradient

The sedimentation properties of the final fraction, concentrated and diluted crude extract and the alumina fraction, and the effects of some cytoplasmic fractions on the final fraction sedimentation properties have all been examined.

For each gradient, one series of aliquots was used for total DNA methylase activity determination, and another was incubated in the same conditions to measure the ratio of the separate activities along the gradient. The total activity curve was then analysed using this data.

Sedimentation of Final Fraction Methylase Activity. The single peak obtained when overall activity was measured may be resolved into separate peaks after measurement of activity ratios. Apparent sedimentation coefficients were 3.0 S for adenine methylating activity and 3.8 S for cytosine methylating activity (Fig. 5A). This pattern is unaffected by large variations of ionic strength: 0.05 M KCl, 0.5 M KCl, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$. At lower ionic strength activities are destroyed during the centrifugation.

Sedimentation of Diluted Alumina Fraction a Crude Extract. Centrifugations of these fractio were performed in 10 mM Tris buffer pH 8.0 + 0.5 KCl to prevent non-specific aggregates formatio When 5 to 10 units of these fractions are sedimen ed, the profile obtained is the same as the one give for the final fraction (Fig. 5B). Only the relative rat between the peaks are modified.

Sedimentation of Concentrated Alumina Fracti and Crude Extract. Fig. 5C shows the sedimentatio profile obtained when 120 units of alumina fractio are sedimented. Cytosine methylating activity st appears as a single peak but its apparent sediment tion coefficient is increased to values ranging fro 4.3 to 4.9 S. As to the adenine methylating activit one observes in addition to the 3.0-S peak a heavi component whose apparent sedimentation coe ficient may be estimated to be in the range of 4 to 4.6 S according to the experiment. When centr fuged in the same conditions, crude extract (60 U gives a similar profile, although its shape is slightl distorted as an effect of sample viscosity. When r

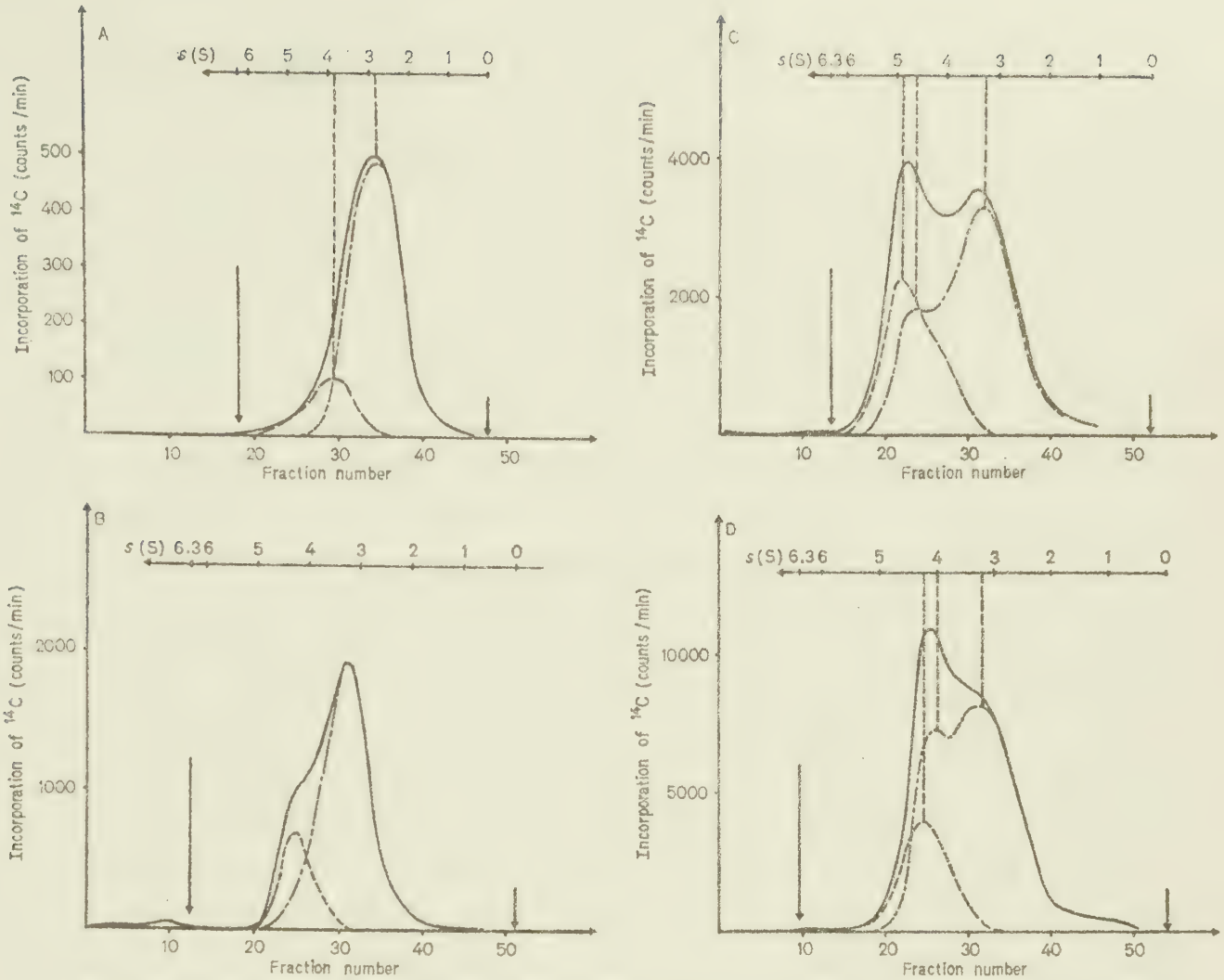


Fig. 5. *Sedimentation of DNA-methylase activities in 5%—20% linear sucrose gradients.* 5-ml gradients were centrifuged at 4 °C in a L_2-65-B model Spinco ultracentrifuge. All buffers contained 10 mM Tris and 50 mM 2-mercaptoethanol. Alkaline phosphatase from *E. coli* (6.3 S) was used as a marker. Alternate aliquots were used for measuring total activity and percentage of adenine methylase activity. (A) Sedimentation of final fraction (160 units) in 50 mM KCl, 57000/rev./min for 13 h 30 in a SW-65 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]-methionine (20 counts × min^{-1} × pmol^{-1}) was added for 1 h at 37 °C. (B) Sedimentation of diluted alumina fraction (7 units) in 0.5 M KCl, 50000/rev./min for 17 h in a SW-50-1 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine (95 counts × min^{-1} × pmol^{-1}) was added for 2 h at 37 °C. (C) Sedimentation of concentrated alumina fraction (75 units) in 0.5 M KCl, 50000/rev./min for 17 h in a SW-50-1 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*^{14}C]methionine (20counts × min^{-1} × pmol^{-1}) was added for 1 h at 37 °C. (D) "Reconstitution" experiment in 0.5 M KCl, 64000/rev./min for 15 h in a SW-65 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine (20 counts × min^{-1} × pmol^{-1}) was added for 1 h at 37 °C. ——, total incorporation of ^{14}C; – – – –, incorporation of ^{14}C into methyladenine; ·····, incorporation of ^{14}C into methylcytosine; short arrow, top of the gradient; long arrow, alkaline phosphatase

DNA is added to the incubation mixture, no automethylating activity is detected along the gradient.

"Reconstitution" Experiments. These results suggest the existence, in crude extract as well as in the alumina fraction, of one or several factors able to modify reversibly the adenine and cytosine methylating sedimentation profiles. To test such an hypothesis, the following experiment was made. An alumina fraction was dialysed against 10 mM potassium phosphate buffer pH 7, 0.5 M NaCl, 20 mM 2-mercaptoethanol and thermoinactivated at 43 °C for 15 min. The precipitate was discarded and 200 µl of supernatant was mixed with 10 µl (110 units) of purified enzyme at 0 °C. The mixture was centrifuged as before on a sucrose gradient. Fig. 5D shows that the profile obtained is the same as the one of the original alumina fraction. The same result has been obtained using a crude extract heated at 60 °C for 10 min as the factor source. On the contrary a crude extract ultrafiltrate (Schleicher & Schüll membrane with M_r cut = 10000) is without effect on final fraction profile.

2 - 5 : DISCUSSION.

L'activité des enzymes purifiés d'après la méthode décrite au chapitre 1 varie, en fonction du PH du milieu, d'une manière remarquablement similaire. Les optimums de PH ne diffèrent pas de plus de 1/10ème d'unité. D'autre part, les deux enzymes sont fortement inhibés aux PH alcalins par l'accroissement de la force ionique. Si l'on représente les variations de $\log_V$ en fonction du PH d'après Laidler (1955), on peut mesurer les valeurs Pf_1 et Pf_2 correspondant aux intersections des pentes avec les plateaux. Ces valeurs doivent être interprétées avec une extrême prudence, car elles peuvent refléter soit les variations de V_{max}, soit celles du K_m, soit les deux. Néanmoins, les intersections du côté des faibles PH sont les mêmes pour les deux enzymes et ne dépendent pas de la force ionique dans la gamme étudiée. La valeur obtenue, soit 6,7 $\pm$ 0,2, pourrait correspondre au noyau imidazolium de l'histidine ou à l'ammonium α de la cystine (d'après Benesch, 1955). En revanche, les intersections du côté des PH alcalins, s'ils restent les mêmes pour les deux enzymes, varient fortement avec la force ionique. Ces variations proviennent des interactions intramoléculaires de la protéine (ou de l'ADN) et de leur dépendance avec la force ionique du milieu. Les valeurs de Pf_2 varient linéairement en fonction de la racine carrée de la force ionique, selon la loi de Debye simplifiée ($Pk' = Pk_o + BZ^2\sqrt{\mu}$), et donnent un Pf_{2o} égal à 11,6. Cette valeur pourrait correspondre au Pk du groupement guanidinium de l'arginine (Benesch, 1955).

L'adénine et la cytosine-méthylase ont d'autre part des K_m voisins pour la S-adénosyl méthionine : 4×10^{-6} M et 8×10^{-6} M, respectivement, à PH 8. Ces valeurs sont voisines de celles qui ont été mesurées pour les enzymes de modification de E. coli. Cependant, l'action des analogues de la S-adénosyl-méthionine permet de mettre en évidence plusieurs différences de spécificité des deux méthylases. En premier lieu, la cytosine-méthylase est inhibée par les dérivés butyl et isobutyl de la thioadénosine alors que l'adénine-méthylase y est insensible. En second lieu, la cytosine-méthylase est 18 fois plus sensible

à l'inhibition par le produit, la S-adénosyl homocystéine, que par la S-adénosyl éthionine, alors que l'adénine-méthylase a la même affinité pour ces deux composés. Cette différence peut provenir soit d'un effet stérique du groupe éthyl, soit d'une répulsion électrostatique par le sulfonium, qui existeraient pour l'un des enzymes mais non pour l'autre. Il serait intéressant d'étudier l'effet comparé de dérivés du type isopropyl-sulfonium, et des sulfoxydes. Quoiqu'il en soit, nos résultats vont dans le même sens que ceux de Kaye et coll. (1967) qui ont observé une faible incorporation de groupes éthyls dans l'adénine -et non dans la cytosine- de M. lysodeikticus à partir d'extraits de E. coli W incubés avec de la S-adénosyl éthionine marquée.

L'inactivation thermique des méthyl-transférases permet, quant à elle, de mettre en évidence des différences entre les deux enzymes, en tant que protéines considérées globalement. L'énergie d'activation de dénaturation de la cytosine-méthylase varie peu, de même que sa température de demi-transition en dix minutes. En revanche la force ionique joue à la fois sur l'énergie d'activation et la température de demi-transition de l'adénine méthylase. Nous avons vu que la manière dont varient ces paramètres indique une prédominance des interactions hydrophobes. Les expériences de sédimentation en gradient de saccharose montrent que le profil de sédimentation de l'enzyme SE concentré ne varie pas en fonction de la force ionique du milieu. Il est aussi le même que ceux des extraits bruts et fractions AS dilués, malgré les changements de concentrations enzymatiques et de rapports entre les deux enzymes. Les enzymes apparaissent donc, tant d'après leurs profils de sédimentation que leurs propriétés d'inactivation, comme des espèces distinctes et uniques. Cependant l'existence de deux pics d'adénine méthylase sur gel de polyacrylamide (section I, figure 3) suggère que des associations multimoléculaires peuvent se produire à PH 6,2.

Les profils de sédimentation des extraits bruts et fractions AS concentrés présentent deux changements reproductibles par rapport aux mêmes fractions diluées. Le coefficient de sédimentation de la

cytosine/méthylase passe de 3,8 S à 4,3 S tandis qu'un épaulement d'activité adénine méthylase apparaît à 4,0 - 4,6 S. Le fait que la fraction SE concentrée ne présente pas ces changements suggère que ceux-ci sont causés par un ligand perdu en cours de purification. Ce ligand peut être mis en évidence grâce à sa capacité à s'associer aux enzymes de la fraction SE, leur conférant le profil de sédimentation typique des fractions moins purifiées. C'est ainsi que le ligand résiste à un chauffage à 60° C dans les extraits bruts et à 43° C dans les fractions AS, n'est pas présent dans un ultra filtrat d'extrait brut mais persiste après dialyse d'une fraction AS.

La fonction de ce ligand reste inconnue. Nous avons pu montrer qu'il n'est pas responsable de la levée, dans les fractions AS, de l'inhibition des méthylases par le lipopolysaccharide des bactéries Gram négatives. Cette inhibition, par contre, s'exerce sur les deux activités des fractions SE. Ceci attire l'attention sur la nécessité de disposer d'ADN de bactéries Gram$^-$ particulièrement purs dès lors que des enzymes purifiés sont étudiés. C'est ainsi que certaines préparations d'ADN de E. coli B obtenues par la méthode de Marmur se sont avérées insensibles à l'action de l'enzyme purifié par suite de la présence d'un inhibiteur identifiable au lipopolysaccharide.

2 - 6 : BIBLIOGRAPHIE.

BENESCH, R.E., et BENESCH, R., (1955)
J. Amer. Chem. Soc., 77, 5877.

BROCKES, J.P., BROWN, P.R., et MURRAY, K., (1972)
Biochem. J., 127, 1.

FALASCHi, A., et KORNBERG, A., (1965)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 54, 1713.

FUJIMOTO, D., SRINIVASAN, P.R., et BOREK, E., (1965)
Biochemistry, 4, 2849.

GELLERT, M., SMITH, C.E., NEVILLE, D., et ROSENFELD, G., (1965)
J. Mol. Biol., 11, 445.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28, 149.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1964a) *J. Biol. Chem.*, 239, 3858.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1964b) *J. Biol. Chem.*, 239, 3866.

HILDESHEIM, J., HILDESHEIM, R., et LEDERER, E., (1971)
Biochimie, 53, 1067.

HILDESHEIM, J., HILDESHEIM, R., et LEDERER, E., (1972)
Biochimie, 54, 431.

HILDESHEIM, J., HILDESHEIM, R., LEDERER, E., et YON. J., (1972)
Biochimie, 54, 989.

KAHAN, E., KAHAN, F.M., et HURWITZ, J., (1963)
J. Biol. Chem., 238, 2491.

KAUZMANN, W., (1954) *"The mechanism of enzyme action"* Symposium édité par W. Mac Elroy et B. Glasse, John Hopkins Press, Baltimore, Maryland.

KAYE, A.M., FRIDLENDER, B., SALOMON, R., et BAR-MEIR, S., (1967)
Biochem. Biophys. Acta, 142, 331.

KERSTEIN, W., (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 610.

KÜHNLEIN, U. et ARBER, W., (1972) *J. Mol. Biol.*, 63, 9.

LAIDLER, K.J., (1955) *Trans. Faraday Soc.*, 51, 550.

LEHMAN, I.R., (1960) *J. Biol. Chem.*, 235, 1479.

LINEWEAVER, H., et BURK, D., (1934) *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 618.

PETERSEN, G.B., et BURTON, K., (1964) *Biochem. J.*, 92, 666.

ROMANOWSKA, E., (1970) *Anal. Biochem.*, 33, 383.

SCHLENK, F., ZYDEK, C.R., EHNINGER, D.J., et DAINKO, J.L., (1965) *Enzymologia*, 29, 283.

SEVAG, M.G., (1934) *Biochem. E.*, 273, 419.

WELLS, R.D., (1971) in *"Progress in Molecular and Subcellular Biology"* Vol. 2, p. 21, F.E. Hahn éditeur, Springer Verlag, New-York-Heidelberg.

WESTPHAL, O. et JANN, K., (1965) in *"Methods in Carbohydrate Chemistry"* (R.L. Whisler, edit.) Vol. V, p. 86 Acad. Press

ZAPPIA, V., ZYDEK-CWIK, C.R. et SCHLENK, F., (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4499.

Eur. J. Biochem. 27, 53–59 (1972)

DNA Methylases of *Escherichia coli* K12

Evidence for Changes in Their State of Association Following Purification

Jean-Pierre Bouché and Jean-Marie Dubert

Unité d'Immunodifférenciation, Institut de Biologie Moléculaire, Université de Paris VII

(Received December 12, 1971/February 17, 1972)

The overall DNA methylating activity of *Escherichia coli* K 12 has been purified about 1500-fold. This procedure involves the preservation of high ionic strength during successive steps to keep the activity fairly stable. Both adenine and cytosine activities are purified in these conditions although their ratio varies greatly. Thermodenaturation and sedimentation studies on the most purified fraction show that the adenine and cytosine methylating enzymes are unrelated single protein species.

The sedimentation profile of the most purified activity is different from that observed with crude extracts or partially purified fractions. When heat inactivated, these fractions added to the purified enzyme restore the activity profile which they showed when native. Thus changes in sedimentation properties are due to a factor present in these fractions and lost in the course of the purification.

Study of enzymatic methylation of heterologous DNAs *in vitro* using various sources of enzyme has shown that there is a very high strain specificity of these enzymes in *Escherichia coli* [1,2]. The function of this specificity has been elucidated in the case of modification enzymes [3,4] while its role in general methylation remains unknown.

Among general methylation enzymes, those from *E. coli* K12 have been purified and studied with respect to some of their properties [5,6]. *E. coli* K12 possess two methylating enzymes one of which methylates adenylic residues, while the other methylates cytidylic residues.

Gold and Hurwitz found that these enzymes remained associated in the course of a 500-fold purification [5]. The ratio between activities remained practically constant and thus suggested a close association between the proteins involved.

However, adenine and cytosine methylating activities may be distinguished following three main criteria:

a) the methylated base;

b) their strain specificity: strains from *E. coli* K12, W, C, *etc.* [1] present both activities while *E. coli* B possesses only adenine methylating activity whose specificity is very near if not identical to K12 activity [1,2];

c) induction during phage infection: in any receptive strain of *E. coli*, T2 induces an enzyme whose specificity appears to be identical to the adenine methylating one [2].

This suggests that adenine and cytosine methylations correspond to distinct physiological functions in *E. coli*.

For these reasons the study of interactions between the two activities and their enzymatic effect may give some clue to their biological role.

This paper describes a new method of purification of *E. coli* K12 methylating activity and examines the interaction between activity-bearing proteins studied under various conditions.

Enzymes. Orthophosphoric monoester alkaline phosphohydrolase or alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1); *S*-adenosylmethionine : DNA adenyl *N*-methyltransferase or adenine methylase (EC 2.1.1.–); *S*-adenosylmethionine : cytosyl *C*-methyltransferase or cytosine methylase (EC 2.1.1.–).

MATERIALS AND METHODS

Strains and Growth Conditions

E. coli K12 MRW 25 (*end*$^-$) was kindly supplied by Dr Michel Wright.

Bacteria were grown in M. L. Medium (10 g bacto tryptone, 5 g yeast extract, 5 g sodium chloride per liter, pH 7.3) supplemented with 1‰ glucose, harvested in late exponential phase, washed with 5 mM Tris pH 8 and kept frozen at — 20 °C.

Measurement of Total Activity

DNA from *Micrococcus lysodeikticus* was prepared by the method of Marmur [7] except that phenol was used instead of the chloroform-isoamyl alcohol mixture. In some cases this DNA was further purified on hydroxyapatite columns [8] in the presence of 3 M KCl.

S-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine was purchased from C.E.A. (France). Non-labelled *S*-adenosylmethionine was prepared following the method described by Schlenk *et al.* [9]. It was more than 95% pure as shown by cellulose thin-layer chromatography (solvent: ethanol—acetic, acid—water, 63:1:34, v/v/v).

The incubation medium contained in 200 µl: 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.05 M KCl, 5 mM EDTA, 50 mM 2-mercaptoethanol, 30 µM *S*-adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine (20 counts $\times$ min^{-1} $\times$ pmol^{-1}) and *M. lysodeikticus* DNA (100 nM as nucleotide residues).

When purified enzyme was used, 200 µg bovine serum albumin was added. The mixture was incubated at 37 °C and the reaction stopped by addition of cold 5% trichloroacetic acid in excess under agitation. The precipitate was transferred on to a nitrocellulose filter (pore diameter 0.45 µm), washed 7 times with 5-ml portions of cold 5% trichloroacetic acid, dried and radioactivity measured with 10 ml scintillation fluid (5 g 2,5-diphenyloxazole and 0.25 g 1,4-bis-(5-phenyloxazolyl-2)-benzene in 1 l of toluene). Filters were counted in an Intertechnique SL-30 scintillation counter.

One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which catalyses the incorporation of one picomole of methyl groups per minute in the above conditions.

Measurement of Adenine and Cytosine-Methylating Activities

At the end of the incubation, glass beads (Glasperlen, $d = 180$ µm) were added to the incubation medium and then coprecipitated with DNA and proteins by addition of an excess cold 5% trichloroacetic acid without agitation. The fibrous precipitate was washed gently by successive decantation and resuspension in 5% trichloracetic acid.

After the last washing the precipitate was drained of all trichloracetic acid and transferred to glass tubes (d, 2 mm; height, 40 mm). 20 µl of formic acid was added. The tube was sealed and left at 175 °C for 30 min [10]. Hydrolysate containing free bases was dried at 70 °C, resuspended in a few microliters of distilled water and applied on a cellulose polyethylene-imine thin layer (Merck). The residue was chromatographed using ammoniated water (pH 10.5) as solvent. Radioactive spots were detected and measured with a thin-layer scanner (Berthold) or by counting as described in the preceding section. In these conditions purines and pyrimidines are s parated into two groups and give the following R_f values: adenine + guanine: 0.28, 6-methyl adenin 0.34 and cytosine + thymine + 5-methyl cytosin 0.69. Controls with other solvents show that no oth methylated bases are labelled in the product.

Acrylamide-Gel Electrophoresis

Electrophoresis using 5% acrylamide gels w performed at 3 °C in 0.1 M phosphate buffer pH 6 + 10 mM 2-mercaptoethanol under a field of 7 V/cr Proteins migrate from cathode to anode. pH w kept constant by electrode buffer recycling.

After 7 h of pre-electrophoresis, 100-µl sampl containing 20% glycerol were laid on top of the ge and electrophoresis started.

For activity measurement, gels were cut in slic which were incubated in 200 µl standard mediu for 10 h at 4 °C and 2 h at 37 °C. Proteins were stai ed using 0.1% coomassie brillant blue in 10% acet acid and destained in 10% acetic acid.

Purification Procedure

All operations were carried out at 4 °C. Buffe contained 50 mM 2-mercaptoethanol.

Crude Extract. One weight of frozen bacter was ground with 2.1-times the weight of levigate alumina in a prechilled mortar until a homogeneo and viscous paste was obtained. The paste was h mogeneïsed with 3 volumes of 10 mM Tris-HCl buff pH 8.0 + 1 mM EDTA. The suspension was cla fied by centrifugation at 20000 $\times g$ for 15 min a the pellet discarded. This crude extract show some automethylation activity in the presence adenosyl methionine and in the absence of adde DNA. This activity is lost from the first step of pu fication.

Polyethylene Glycol-Dextran Phase system. T 7 volumes of crude extract two volumes of 30 (w/w) polyethylene glycol (PEG 6000, Compto Français des Produits Aromatiques) and 1 volun of 20% (w/w) dextran (Dextran T 500, Pharmaci were added. The mixture was brought up to 0.14 NaCl with solid salt, and magnetically stirred f 30 min. Phases were then separated by centrifugatio (5 min, 20000 $\times g$) and the upper phase discarde To reconstitute the original volume and polym balance, the upper phase was replaced by an equ volume of a similarly composed polymer solutio For this purpose a 6.6% (w/w) polyethylene glyc solution was added to the dextran phase. Then t mixture was brought up to 1.5 M NaCl, stirred a centrifuged as before. The upper phase containi polyethylene glycol and enzyme was kept.

Adsorption and Fractionated Elution on Alumi Gel. Alumina gel (C_γ, Biorad) at about 25 mg soli per ml, was mixed with the polyethylene glyc

phase to get a solids-proteins ratio near unity. After 5 min the suspension was centrifuged and the supernatant discarded. The alumina precipitate was then washed and eluted by vigorous resuspension (Virtiss) and centrifugation with the following buffers in the order of use: 10 mM Tris-HCl pH 8.0 (once), 0.15 M potassium phosphate pH 6.75 (4 times) and 0.1 M potassium phosphate + 1 M $(NH_4)_2SO_4$ pH 7.1 (3 times).

The enzyme was eluted by this last buffer. Eluates containing activity were pooled, one tenth volume M Tris pH 8 was added and ammonium sulfate concentration brought up to 3 M by addition of solid salt. The protein precipitate was collected by centrifugation and dissolved in a minimal amount of 10 mM Tris buffer, pH 8.0 to give the "alumina fraction". At this stage, the enzyme precipitates non-specifically at low ionic strength. Alumina fraction can be stored at −196 °C without loss of activity.

Hydroxyapatite Chromatography. A column of hydroxyapatite (Clarkson) was washed with several volumes of 1 mM sodium phosphate buffer pH 7 + 0.6 M NaCl. The high ionic strength is used to avoid non-specific aggregations. The alumina fraction, previously equilibrated with this buffer by gel filtration on Biogel P6 (50—100 mesh), was applied at a proportion of 5 mg per milliliter of packed gel. Activity was then eluted by a potassium phosphate gradient ranging from 1 to 70 mM, pH 7.0 or by washing the column with 15 mM phosphate buffer and eluting with 25 mM buffer, pH 7.0, NaCl concentration being kept at 0.6 M.

Chromatography on Sulfo-Ethyl Sephadex A-50. Proteins from the active fraction of hydroxyapatite chromatography had lost most of their property of non-specific precipitation at low ionic strength. The eluate was filtrated on Biogel P6 (50—100 mesh) to be equilibrated with 0.15 M potassium phosphate buffer pH 6.5 + 1 mM EDTA. It was then applied on a column of sulfo-ethyl Sephadex equilibrated with this buffer, to give a proportion of 5 mg of proteins per milliliter of packed beads.

The column was washed with 0.2 M potassium phosphate and the activity eluted by 0.35 M phosphate. The final fraction was obtained by dialysis of the eluate against 0.1 M phosphate buffer pH 7.0, 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA containing 50% glycerol. This fraction was kept at −20 °C and showed no loss of activity for several months.

RESULTS

Purification of Adenine and Cytosine-Methylating Activities

All the steps of purification require a high ionic strength. A high salt concentration stabilises the DNA methylase activities and prevents non-specific aggregations. At any concentration, monovalent anions do not prevent protein fixation on alumina gel (step 2) or on hydroxyapatite (step 3). On the contrary only divalent anions show eluting power.

Table 1 shows the fractionation of DNA methyl transferase activities of *E. coli* K12. Although both activities are eluted together at any step, the activity ratio changes during the purification leading to a relative enrichment of adenine methylating activity. Enzyme ratios measured during separate purifications failed to show any enzymatically significant changes of these ratios between any two steps.

Mobility on Acrylamide Gels

10 µl of final fraction were used for these experiments (*i.e.* 160 units and 30 µg). After 15 h of electrophoresis at pH 6.2 (see Materials and Methods),

Table 1. *Purification of DNA-methylase activity of* E. coli *K 12*
340 g of crude enzyme was used

Enzyme fraction	Total activity	Protein concn	Volume	Specific activity	Purification	Yield	Adenine methylating activity
	units	mg/ml	ml	units/mg	-fold	%	%
Crude extract	230000	26.5	1105	8	1	100	48
Polyethylene glycol Phase II	193000	5.8	1205	28	3.5	84	
Ammonium sulfate (alumina fraction)	160000	18.4	42	206	26	70	66
Hydroxyapatite eluate	103500	0.060	720	2350	300	44	75
Sulfoethyl-Sephadex eluate	45000	0.37	8	15000	1900	19	82
Final preparation	32000	1.5	2	10700	1350	14	82

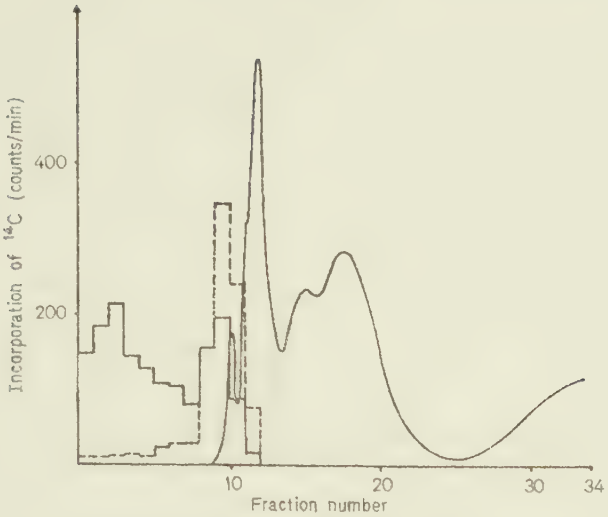


Fig. 1. *Electrophoresis of the final fraction on 5% acrylamide gel.* Two gels were run in parallel for 14 h at 7 V/cm. At the end of the run, the first gel was cut in slices. Each slice was incubated overnight at 4 °C and then 4 h at 37 °C in 200 µl of standard incubation medium. Discontinuous curves: ——, adenine methylating activity; – – –, cytosine methylating activity. The second gel was stained with coomassie brilliant blue and the absorbance was measured in a chromoscan (Gilford Instruments). Continuous curve: ——, absorbance, arbitrary units

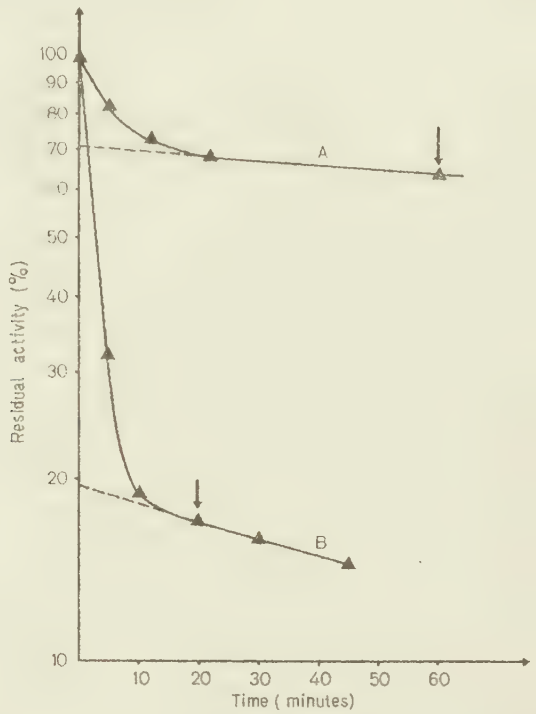


Fig. 2. *Thermo-inactivation of an alumina fraction containi 70.5% adenine methylase activity before heating (A) at 42 ° and (B) diluted and heated at 37 °C.* (A) Initial concentr tion: 4300 U/ml in 10 mM Tris buffer pH 8, 1 mM $(NH_4)_2S$ 50 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA. At the time ind cated by the arrow a duplicate was kept which contained 95% adenine methylating activity. (B) The same initial samp was diluted ten-fold in 100 mM Tris buffer pH 8, 50 m 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA and then it was denature at 37 °C. At the time indicated by an arrow a duplicate w kept for hydrolysis which contained 9% adenine methyla ing activity

activity and concentration profiles become completely separated. Neither activity can be detected in stained-proteins zone, nor proteins in the active part of the gel. Thus it appears that final fraction contains less than 5% active enzyme and subsequently the overall activity should be purified more than 25000-fold to get pure enzyme. To control this result, electrophoresis was repeated and fixation was performed in drastic conditions using 50% trichloroacetic acid. The protein profile was the same as before.

A typical activity profile (Fig. 1) always shows a cytosine methylating activity peak on the anodic side, overflowing slightly the adenine methylating peak. Furthermore there appears a slowly migrating adenine methylating peak. In our conditions, 10 h of elcctrophoresis are required to obtain a resolution of the activity profile. Longer times, 25 to 30 h, lead to excessive adenine methylating inactivation. These conditions render it difficult to study enzyme associations by means of analytical electrophoresis on acrylamide gel.

Thermal Denaturation of Purified Enzyme

Fig. 2 shows the thermal inactivation of an alumina fraction (see Materials and Methods) in two conditions of ionic strength and concentration. The enzyme is inactivated in two steps. Each one corresponds to the inactivation of one kind of activity.

When enzyme from the final fraction was heate for 10 min at various temperatures a residual-acti ity curve showed two distinct sharp inactivatio phases, each one corresponding to the loss of one typ of activity (Fig. 3).

Such curves allow for the determination of th temperatures for which the half life of each activit is 10 min (T_{10}).

Fig. 4 A shows the variations of T_{10} as a functio of the initial enzymatic concentration when heatin was performed in 0.1 M potassium phosphate buff pH 7.0 in the presence of 400 µg/ml bovine seru albumin. T_{10} variations of both activities are ident cal and of limited extent.

In the next experiment T_{10} of each activity wa measured at various saline concentrations, the initi enzyme concentration being kept equal to 1600 U/m Results shown in Fig. 4 B indicate that T_{10} is qui invariant for cytosine methylating activity whi a 22 °C variation is observed for adenine methylatin activity.

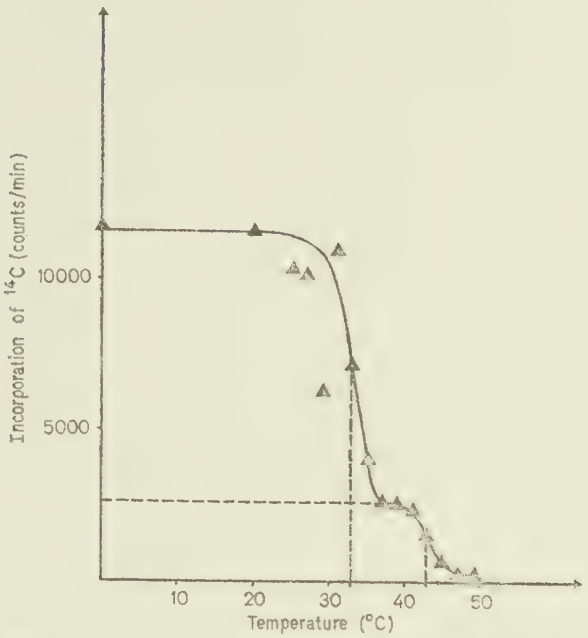


Fig. 3. *Inactivation of the final fraction.* Enzyme (1600 U/ml) in 0.1 M phosphate buffer pH 7 + 0.4 mg/ml bovine serum albumin containing 50 mM 2-mercaptoethanol was denatured for 10 min at the temperatures indicated. Activity was then measured

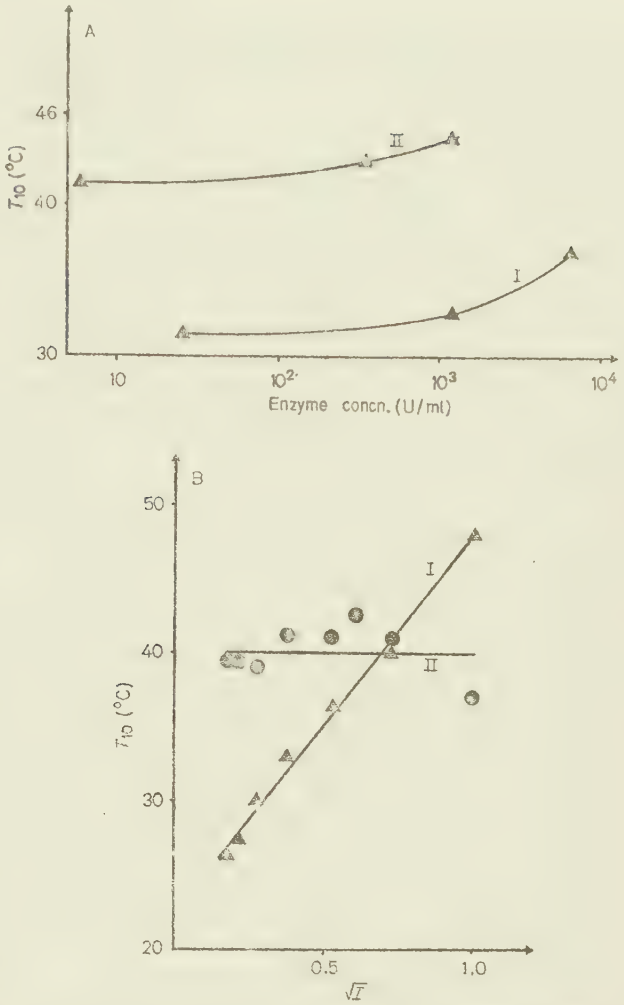


Fig. 4. *Variation of T_{10} as a function of (A) enzyme concentration of each activity and (B) the square root of the ionic strength.* The medium for (A) was the same as in Fig. 3. The medium for (B) contained 10 mM phosphate buffer pH 7, 0.4 mg/ml bovine serum albumin, 50 mM 2-mercaptoethanol and various amounts of NaCl. Initial total enzyme concentration was 1600 U/ml. (I) Inactivation of adenine methylase; (II) inactivation of cytosine methylase

Sedimentation Properties in Sucrose Gradient

The sedimentation properties of the final fraction, concentrated and diluted crude extract and the alumina fraction, and the effects of some cytoplasmic fractions on the final fraction sedimentation properties have all been examined.

For each gradient, one series of aliquots was used for total DNA methylase activity determination, and another was incubated in the same conditions to measure the ratio of the separate activities along the gradient. The total activity curve was then analysed using this data.

Sedimentation of Final Fraction Methylase Activity. The single peak obtained when overall activity was measured may be resolved into separate peaks after measurement of activity ratios. Apparent sedimentation coefficients were 3.0 S for adenine methylating activity and 3.8 S for cytosine methylating activity (Fig. 5 A). This pattern is unaffected by large variations of ionic strength: 0.05 M KCl, 0.5 M KCl, 0.2 M $(NH_4)_2SO_4$. At lower ionic strength activities are destroyed during the centrifugation.

Sedimentation of Diluted Alumina Fraction and Crude Extract. Centrifugations of these fractions were performed in 10 mM Tris buffer pH 8.0 + 0.5 M KCl to prevent non-specific aggregates formation. When 5 to 10 units of these fractions are sedimented, the profile obtained is the same as the one given for the final fraction (Fig. 5 B). Only the relative ratio between the peaks are modified.

Sedimentation of Concentrated Alumina Fraction and Crude Extract. Fig. 5 C shows the sedimentation profile obtained when 120 units of alumina fraction are sedimented. Cytosine methylating activity still appears as a single peak but its apparent sedimentation coefficient is increased to values ranging from 4.3 to 4.9 S. As to the adenine methylating activity, one observes in addition to the 3.0-S peak a heavier component whose apparent sedimentation coefficient may be estimated to be in the range of 4.0 to 4.6 S according to the experiment. When centrifuged in the same conditions, crude extract (60 U) gives a similar profile, although its shape is slightly distorted as an effect of sample viscosity. When no

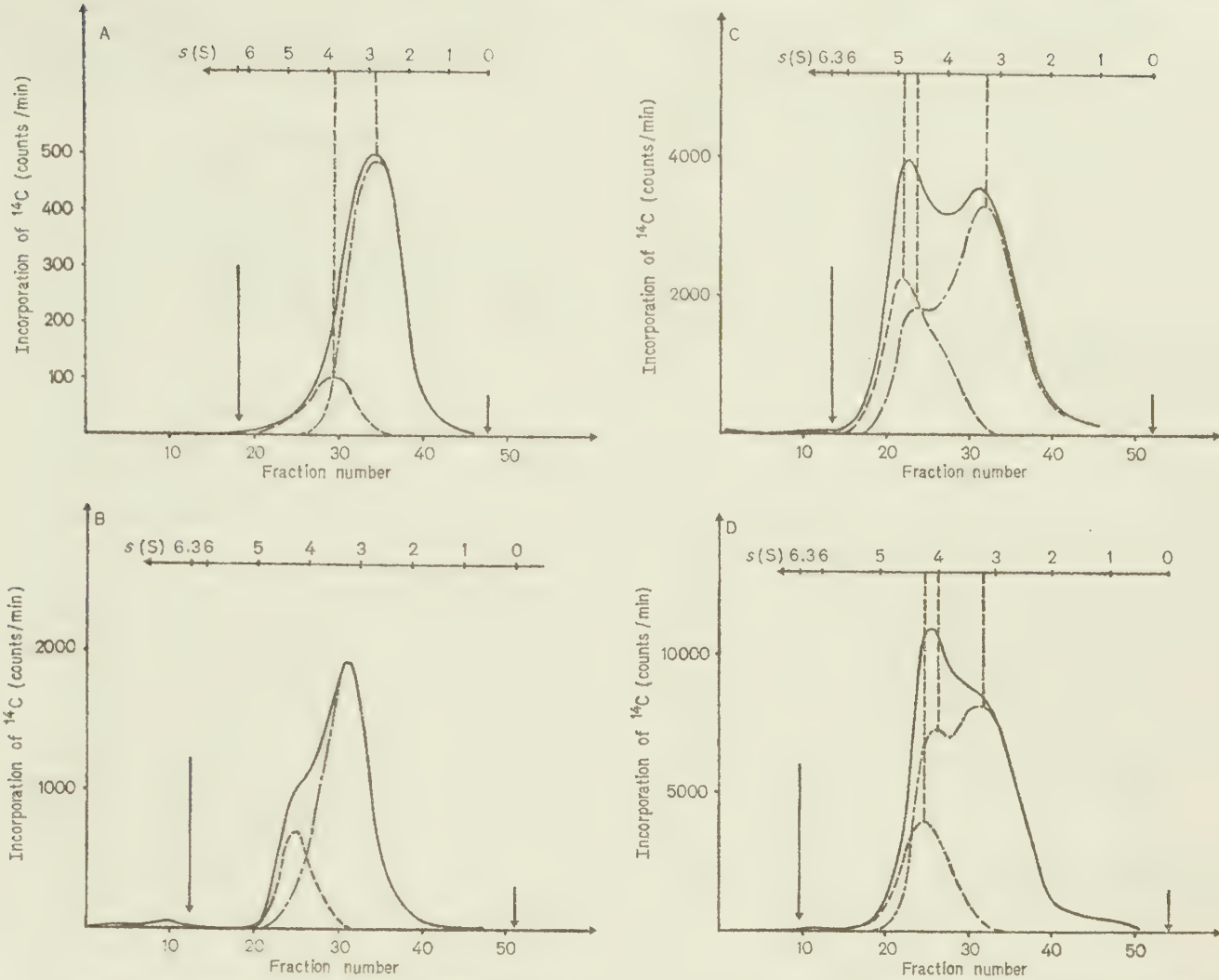


Fig. 5. *Sedimentation of DNA-methylase activities in 5%—20% linear sucrose gradients.* 5-ml gradients were centrifuged at 4 °C in a L_2-65-B model Spinco ultracentrifuge. All buffers contained 10 mM Tris and 50 mM 2-mercaptoethanol. Alkaline phosphatase from *E. coli* (6.3 S) was used as a marker. Alternate aliquots were used for measuring total activity and percentage of adenine methylase activity. (A) Sedimentation of final fraction (160 units) in 50 mM KCl, 57000/rev./min for 13 h 30 in a SW-65 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]-methionine (20 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) was added for 1 h at 37 °C. (B) Sedimentation of diluted alumina fraction (7 units) in 0.5 M KCl, 50000/rev./min for 17 h in a SW-50-1 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine (95 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) was added for 2 h at 37 °C. (C) Sedimentation of concentrated alumina fraction (75 units) in 0.5 M KCl, 50000/rev./min for 17 h in a SW-50-1 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*^{14}C]methionine (20counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) was added for 1 h at 37 °C. (D) "Reconstitution" experiment in 0.5 M KCl, 64000/rev./min for 15 h in a SW-65 rotor. *S*-Adenosyl-L-[*Me*-^{14}C]methionine (20 counts × min^{-1} × $pmol^{-1}$) was added for 1 h at 37 °C. ——, total incorporation of ^{14}C; – – – –, incorporation of ^{14}C into methyladenine; -----, incorporation of ^{14}C into methylcytosine; short arrow, top of the gradient; long arrow, alkaline phosphatase

DNA is added to the incubation mixture, no automethylating activity is detected along the gradient.

"Reconstitution" Experiments. These results suggest the existence, in crude extract as well as in the alumina fraction, of one or several factors able to modify reversibly the adenine and cytosine methylating sedimentation profiles. To test such an hypothesis, the following experiment was made. An alumina fraction was dialysed against 10 mM potassium phosphate buffer pH 7, 0.5 M NaCl, 20 mM 2-mercaptoethanol and thermoinactivated at 43 °C for 15 min. The precipitate was discarded and 200 µl of supernatant was mixed with 10 µl (110 units) of purified enzyme at 0 °C. The mixture was centrifuged as before on a sucrose gradient. Fig. 5 D shows that the profile obtained is the same as the one of the original alumina fraction. The same result has been obtained using a crude extract heated at 60 °C for

10 min as the factor source. On the contrary a crude extract ultrafiltrate (Schleicher & Schüll membrane with M_r cut = 10000) is without effect on final fraction profile.

DISCUSSION

We have developed a new procedure of purification of DNA methylases from *E. coli* K12. This method involves phase partition, adsorption on and elution from alumina gel, hydroxyapatite chromatography and sulfoethyl Sephadex chromatography. The 1500-fold purified enzyme is nevertheless no more than 5% pure on polyacrylamide gel electrophoresis.

Each step of purification leads to a relative enrichment of adenine methylating activity but no separation from cytosine methylating activity could be achieved. This relative similarity in behaviour during purification may be related to some analogies in their enzymatic properties: each enzymatic activity presents an ionic strength optimum between 0.05 and 0.16 M according to pH and salts used. With 0.16 M KCl, their pH optimum are 7.8 for adenine and 8.1 for cytosine methylase. Both reactions are equally inhibited by actinomycin [12] contrarily to previously described results [6].

Sucrose gradient sedimentation of the final fraction gives two distinct peaks, thus indicating that the enzymes are not necessarily linked.

Thermal inactivation of the enzymes as a function of enzymatic concentration does not show any abrupt change of the temperature of inactivation. On the other hand ionic strength sensitivity of inactivation shows that denaturation of each enzyme does not depend upon their order of inactivation, but only of ionic strength itself. This indicates that an association-dissociation equilibrium between adenine and cytosine methylases, if it exists, has little effect, if any on their thermoinactivation properties.

Sedimentation experiments show that the profiles of purified concentrated enzyme are the same at any ionic strength. They are also the same as those of diluted crude extract and semi-purified fractions, despite the changes in enzymatic concentration and enzyme ratios. All these results render unlikely the existence of an association-dissociation equilibrium of final fraction enzymes. However the existence of two adenine methylase peaks on acrylamide gel suggest that multimolecular associations could occur at pH 6.2. The alternative hypothesis, *i.e.* the existence of two adenine methylating enzymes, is unlikely since in this case both should have the same sedimentation coefficient and temperature susceptibility.

Sedimentation profiles of concentrated crude extract and semi-purified fraction present two reproducible modifications *versus* diluted extracts. The sedimentation coefficient of cytosine methylase shifts from 3.8 to 4.3—4.9 S and a shoulder appears on the adenine methylase peak at 4.0—4.6 S.

The fact that concentrated final fraction does not show these modifications suggest that they are caused by a ligand lost in the course of the purification. Such a ligand was seen in crude extracts heated at 60 °C and in semi-purified fractions inactivated at 43 °C by its ability to restore the modified profile when mixed to the final fraction. It is present in a semi-purified dialysed fraction but absent from a crude extract ultrafiltrate.

Thus two main association equations may account for the modification profiles according to whether the complex involves both enzymes or only one in addition to the ligand X:

$$A + X + C \rightleftharpoons AXC \quad (1)$$

$$A + X \rightleftharpoons AX; C + X \rightleftharpoons CX \quad (2)$$

As other properties of thermoinactivated semi-purified fraction, we can note that it coprecipitates strongly with DNA and stimulates micrococcal DNA methylation rate up to 50% (unpublished results). The existence of factors stimulating specifically the methylation reaction is suggested by the fact that T_2-induced DNA methylase looses its ability to methylate T2 DNA when purified [12, 13].

Two questions presently under study arise from these observations are (a) is the same factor implied in sedimentation modifications and in the enzymatic activation and (b) is the stimulation related to specificity modifications?

This work was supported by grant from the *Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique* (70 02 270) and by the *Commissariat à l'Energie Atomique*.

REFERENCES

1. Gold, M. & Hurwitz, J. (1963) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28*, 149.
2. Fugimoto, D., Srinivasan, P. R. & Borek, E. (1965) *Biochemistry, 4*, 2849.
3. Smith, J., Arber, W. & Kühnlein, U. (1972) *J. Mol. Biol. 63*, 1.
4. Arber, W. & Linn, S. (1969) *Annu. Rev. Biochem. 38*, 467.
5. Gold, M. & Hurwitz, J. (1964) *J. Biol. Chem. 239*, 3858.
6. Gold, M. & Hurwitz, J. (1964) *J. Biol. Chem. 239*, 3866.
7. Marmur, J. (1961) *J. Mol. Biol. 3*, 208.
8. Vischer, E. & Chargaff, E. (1948) *J. Biol. Chem. 176*, 715.
9. Schlenk, F., Zydek, C. R., Ehninger, D. J. & Dainko, J. L. (1965) *Enzymologia, 29*, 283.
10. Bernardi, G. (1969) *Biochim. Biophys. Acta, 174*, 423.
11. Albertssön Per-Ake (1960) *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Almqvist and Wiksells Boktryckeria ab Uppsala.
12. Hausmann, R. & Gold, M. (1965) *J. Biol. Chem. 241*, 1985
13. Gold, M., Gefter, M., Hausmann, R. & Hurwitz, J. (1966) in *Macromolecular Metabolism*, J. & A. Churchill Ltd, London.

J.-P. Bouché and J.-M. Dubert
Institut de Biologie Moléculaire, Université de Paris VII
2 Place Jussieu, F-75 Paris 5, France

Current Title : Synthesis of unmethylated DNA in a dna B Temperature-sensitive mutant of Escherichia coli starved for methionine.

Running Title : Methionineless DNA synthesis in Escherichia coli K

Subject section : Genetics and Molecular Biology

Author : Jean-Pierre, C. BOUCHE

Address : Institut de Biologie Moléculaire, Université Paris VII
2, Place Jussieu, 75 005 - PARIS (France)

Published in the *Journal of Bacteriology*, 115, (3) 752, (1973).

ABSTRACT :

Strain CRT 266, a polyauxotrophic dna B temperature-sensitive mutant of Escherichia coli K, was investigated for residual DNA synthesi when returned to the permissive temperature in the absence of protein synthesis.

In the presence of methionine, a delayed extra-initiation occu as well an an erratic long-lasting synthesis. In the absence of methioni there is no evidence for extra-initiation, while the long-lasting synthesis is only slightly depressed. A direct role of methionine independe of protein synthesis in the extra-initiation process is postulated.

The largest residual syntheses, with or without methionine, are obtained when 1) bacteria are first grown in a rich medium, 2) bacteria are shifted to the non-permissive temperature for two hours in the same medium, and 3) bacteria are then starved for aminoacid for 20 hours at the permissive temperature. Under these conditions, DNA extracted fro methionine-starved cells appears to be a mixture of half-methylated and unmethylated products. The possibility of the occurence of a few methyl groups on the so-called unmethylated DNA is discussed.

The modification of strain CRT 266, a temperature-sensitive derivative of strain CR 34 (20), is known to involve DNA elongation (6). At 40°C, DNA synthesis stops abruptly and the arrest is reversed by a decrease in temperature but not high salt concentrations (19). Worcel (26) and Schwartz and Worcel (22) showed that a 15 minute shift to 40°C followed by a 15 minute period at 30°C, both in conditions allowing protein synthesis, is sufficient to induce an extra-initiation* in this mutant.

Longer periods at 40°C failed to induce more than one extra-initiation, but repeated sequences of shifts up and down gave rise to additional initiations. On the other hand, if chloramphenicol is added just at the time of the return to 30°C, at least 40 minutes at 40°C are necessary to produce one extra-initiation (22). These observations have been used as a basis for finding conditions giving the highest relative increase of DNA content in the cells after the non-permissive period and in the absence of protein synthesis.

During the course of this study a difference appeared between the amount of residual synthesis obtained in the presence and in the absence of methionine. It was questionable to know at what level methionine exerted an effect on residual synthesis, since the role of enzymatic methylation in DNA replication is still unclear (7). Kogoma and Lark (8) compared residual synthesis in the absence of methionine after thymine starvation in strains 15T$^-$ and K_{12} thy$^-$ strains. They found

---

* The term "initiation" will be used for any initiation sequentially linked to the end of a preceeding round of replication. Abnormal initiations triggered by interrupting DNA elongation in the culture will be refered

that DNA synthesis in strain 15T⁻ comes rapidly to a halt but continues for several hours in K strains. They interpreted this difference in terms of the requirements of specific endonucleases. The K specific endonucleas belongs to the K, B, A family of autosomal endonuclease of E. coli, which are indeed the only known restriction nucleases to possess an absolute requirement for S-adenosyl-methionine in vitro (3, 14, 16 and R. Yoshimor cited in reference 17). Thus, it could be supposed that unmethylated DNA might accumulate in the strain CRT 266 when starved for methionine after a period at 40°C. Results reported in this paper show that such DNA actually is synthesized, although a small extent of methylation cannot be ruled out. A possible explanation of the specific effect of methionine on the amount of residual synthesis is examined in relation with this finding.

MATERIAL AND METHODS :

Strain and growth conditions

Strain CRT 266 : F^-, dna B, thr, leu, metB, thy, thi, ton A, lac Y, phenotypicaly m_k^+ r_k^+ and strigent for RNA synthesis was kindly supplied by Dr M. Schwartz and used in all the experiments. Usually, bacteria were kept in stock in minimal growth medium with 10 % glycerol at -30°C. A sample from this stock was used for each preculture. Bacteria were grown with vigorous shaking in synthetic medium, (M63, Pardee, Monod, Jacob 1959) with 2 °/₀₀ glucose and the following supplements :thymine and L-methionine, 20 µg/ml ; L-threonine and L-leucine, 40 µg/ml ; and vitamin B. At 30°, the doubling time was approximatively 90 minutes. When casamino acids (Difco) were added, the doubling time became 60 minutes.

For density labelling experiments, $^{15}NH_4Cl$ 95 % isotopicaly labelled (Azote et Produits Chimiques) and K_2SO_4 replaced the $(^{14}NH_4)_2SO_4$ in the M_{63} medium and 90 % deuterated glucose (I.C.N.) was used as a carbon source.

DNA labelling

For total or residual measurement, ^{14}C thymine (CEN-SCK, Belgium) was added at 0.25 µCi/ml of culture medium. 0.5 ml or 1 ml samples were withdrawn, mixed with cold 5 % TCA, left at 0°C for at least 15 minutes, filtered on 0.45 µ Schleicher and Schull nitrocellulose filters and counted in an SL 30 Intertechnique Scintillation counter.

For uniform labelling the strain was grown overnight in labelled medium and the culture was diluted in fresh labelled medium to approximatly 4×10^7 cells/ml. Cultures were not allowed to grow above 2×10^8 cells/ml before the temperature shift.

Media changes and Phenethyl alcohol treatment

All changes of media were performed by filtration on 0.45 μ nitrocellulose filters. Bacteria were washed with prewarmed light 63 medium and resuspended. The complete operation required 2-4 minutes. For phenethyl alcohol treatment 1 % of the redistilled alcohol (v/v) was added to M63 minimal salts medium. One volume of this solution was mixed with 3 volumes of culture at time zero of the treatment.

Methyl-labelling of methyl groups and DNA extraction

For labelling of methyl groups, ^{3}H methionine (C.E.A., France) was added at 25 μCi/ml. When casamino acids were used, the specific activity was adjusted on the assumption that Acidicase (Difco) contains 37 % salts and 2.8 % methionine (5).

For DNA extraction 4 ml samples of cultures were filtered, washed with 20 ml of M 63 medium, resuspended in 5 ml of 10^{-2}M Tris buffer pH 7.5, 10^{-3}M EDTA, centrifuged and resuspended in 0.3 ml of the same buffer. 0.1 ml of 25 % Sarcosyl (NG 97, Geigy) was added. After 5 minutes at 30°C, the suspension was diluted to 6 ml with the same buffer. The lysate was then treated with 20 μg/ml preheated pancreatic RNase (Calbiochem, A grade) for 10 minutes at 37°C ; 100 μg/ml protease (Sigma, repurified, type VI) was added and the suspension was incubated at 37°C for 30 minutes ; 100 μg/ml protease were again added for a further 3 to 4 hours of incubation.

CsCl centrifugation

Cell lysates were brought to 7.39 ml by adding 10^{-2}M Tris buffer, pH 7.5, and 9.806 g cesium chloride was gently dissolved. Density was then

adjusted to 1.720 by adding more buffer or cesium chloride, and 9 ml of the final solution were used for each gradient. Centrifugation was performed in the Spinco fixed angle 65 rotor in lusteroid tubes at 27.000 rpm for 55 hours at 20°C.

Gradients were transferred to a fraction collector through a capillary plunged to the bottom of the tubes and connected to a peristaltic pump. About 70 fractions were collected per gradient.

Determination of radioactivity

To each fraction, 500 µg total RNA was added and the mixture was precipitated with 5 % TCA and filtered. Vials were counted in the 3 channel Intertechnique SL 30 scintillation counter. A channel was selected that gave a relative efficiency of 47 % for ^{14}C and 0 % for ^{3}H. ^{3}H was deduced by difference from the fully open channel and corrected for background.

RESULTS

Kinetics of the resumption of DNA synthesis.

The kinetics of the resumption of DNA synthesis are presented in figure 1.

In this experiment, a culture was grown with unlabelled thymine at 30° C and shifted to 40°C at time zero. After 5 minutes ^{14}C thymine was added. At various times samples were withdrawn and returned to 30°C with or without chloramphenicol. The kinetics of thymine incorporation are determined in these subcultures.

The long dashed line in figure 1A shows the incorporation at 40°C, which as expected, is very slight.

The short dashed lines in figure 1A show the kinetics of incorporation of samples returned to 30°C in the absence of chloramphenicol. Rates of DNA synthesis become constant, at the time scale retained for this experiment, after a 8 to 15 minutes lag at 30°C. These rates, plotted in figure 1B (dashed lines), become maximal after a 40 minute period at 40°C. Since protein synthesis continues after return of the cells to 30°C, we assume that these rates reflect the fraction of the cells in which the synthesis of those proteins necessary for extra-initiation had begun at 40°C. If this assumption is true, the long delay before a constant rate is obtained at 30°C is due to the time needed to complete this protein synthesis.

This hypothesis is supported by the kinetics of thymine incorporation in the presence of chloramphenicol. As seen in figure 1A (solid lines), constant rates of DNA synthesis are obtained after a much shorter lag : 4-5 minutes. It is likely that this short lag results from the slow reversal of the elongation halt. The constant rates are lower in the pre-

sence of chloramphenicol than in its absence. In the presence of chloramphenicol, the rate of incorporation reflects the fraction of the cells in which synthesis of proteins necessary for extra-initiation was finished at 40°C. Its variations are plotted in figure 1B (solid lines).

Thus, the time difference between the incorporation rates plotted in figure 1B is a measure of the time needed to synthesize initiation proteins at 40° C. Under our experimental conditions this time is 17 minutes. Figure 1B also shows that under our experimental conditions induction of the chloramphenicol-sensitive step is not synchroneous. A halt in DNA elongation may be not the only condition required for this induction.

Dependance of residual synthesis on prior time at 40°C.

In all subsequent experiments, DNA was labelled in precultures and during the experiment with ^{14}C thymine (see Materials and methods). After the preculture, bacteria were grown successively during three phases : Exponential growth at 30°C (first phase) ; growth at 40°C in the presence of protein synthesis (second phase) ; incubation at 30°C in the absence of protein synthesis (third phase). Chloramphenicol addition or aminoacid starvation was effectuated immediately on return to 30°C.

DNA synthesis occuring during the third phase is called "residual synthesis". It is expressed in percent of the amount of DNA present during the second phase.

In order to determine conditions permitting the maximal syntheses after return to 30°C, several parameters were studied ; Duration of the second and third phases, growth conditions during the first and second phases.

Figure 2 shows the residual synthesis in the presence of chloramphenicol as a function of the time at the non-permissive temperature. The residual synthesis measured after 3 hours at 30°C increases from 60 % for unshifted cultures up to 220 % after a 2 hour period at 40°C. After such a two hour period at 40°C, residual synthesis was later shown to continue slowly after 3 hours at 30° C (see following section). After longer periods at 40°C, the rate of incorporation as well as the plateau decreased (data not shown).

Kinetics of residual DNA synthesis.

Figure 3 shows the kinetics of residual incorporation with and without methionine. In this experiment, the culture was filtered after a 2 Hour period at 40°C and the cells were resuspended in a medium lacking methionine. Immediately afterwards the culture was divided into two parts. Methionine and chloramphenicol were added to one half, ethionine and chloramphenicol to the other half. Ethionine was used to compete with the methionine resulting from protein breakdown (21, 24). In both parts of the culture, residual DNA synthesis occured for several hours and was not completed until one day. In this experiment the residual synthesis reached 283 %, and this is more than is expected for a symmetric extra initiation (190 % - 230 %). A fortiori the residual synthesis is much greater than the 120-140 % expected for the assymmetric reinitiation which is likely to occur (26) after the temperature shift.

Residual DNA synthesis was lower in the absence of methionine than in the control. The difference between the curves appeared after 30 minutes, and became maximal at 150 minutes. In this experiment, the absolute difference reached about 55 % of the initial amount of DNA.

control cultures under different conditions (indicated in table I). In all cases, the difference of incorporation increased for a certain period of time and then remained constant for several hours, despite the fact that the DNA content of each culture continued to increase. It may be noted in Table I that, when reuse of protein breakdown products was permitted, the difference obtained reached 75-80 %. This represents approximatively one chromosome, if 100 % is the amount of DNA in a culture growing in glucose medium with one average growing fork per cell.

Effect of phenethyl alcohol

In order to determine with which events the methionine effect is associated, phenethyl alcohol was used at a concentration of 0.25 %. At this concentration DNA remains attached to the membrane[15] and DNA synthesis occurs but no new cycles are initiated (13). If samples of the culture taken at various times after the return to 30°C were made 0.25 % with respect to phenethyl alcohol, DNA synthesis stopped after about 2 hours, whether methionine was present or not. Thus the plateau obtained with phenethyl alcohol in an indirect measurement of the number of cycles initiated before its addition and variation of this plateau reflects the initiation and extra-initiation rate. Figure 4 shows the result of this type of experiment. A culture was grown in the glucose medium, shifted for 2 hours to 40°C, filtered and resuspended at 30°C with or without methionine. At various times samples were withdrawn, made 0.25 % with respect to phenethyl alcohol and further incubated for 3 hours. Figure 4A shows the incorporation of the samples at the time of withdrawal. The result is similar to those shown in figure 3. Figure 4B shows the incorporation of samples after 3 hours with phenethyl alcohol. If

methionine is present, the slope of the curve increases until 50 minutes, indicating an increase of the rate of extra initiations. Then the slope shuts off and returns to a much lower value, indicating initiations of the long lasting synthesis. In the absence of methionine, the curve obtained is consistent with a complete suppression of the wave of extra-initiations, but preservation of initiations of the long-lasting synthesi which is devoid of apparent synchrony.

Influence of growth conditions on residual DNA synthesis.

The increase of the ^{14}C-thymine/optical density ratio from the period of exponential growth in glucose medium (first phase) to the end of the period of residual DNA synthesis with methionine (third phase), is generally close to a factor of 1.6 (Table II, first line). The same increase is obtained when the second phase is eliminated ; i. e., when chloramphenicol is added to exponentially growing cells (figure 2). Although the optical density roughly reflects the protein content, these da are, as expected, consistent with a direct relationship between residual DNA synthesis and protein synthesis during the non-permissive period. Thus, it might be expected that an increase of protein synthesis at 40°C would lead to a concomitant increase of residual DNA synthesis.

On the other hand, long-lasting synthesis in strain 15 T$^-$ is known to consist in a fork-limited replication in which the chromosome to be replicated appears to be chosen at random (8). As the fork limitation during the long-lasting synthesis probably results from the limitation of previously available growing forks, the growth rate at 30°C before the shift up might also be expected to affect residual DNA syn-

Table II shows the dependance of residual DNA synthesis after 20 hours at 30°C in the presence of chloramphenicol, whether casamino acids are present or not during the first and second phase. As expected, both increase of the growth rate and stimulation of protein synthesis at 40°C favor higher residual DNA synthesis.

The kinetics of residual DNA synthesis in the absence of protein synthesis after growth and shift for two hours to 40°C in casamino acid medium are shown in figure 5. Most of the synthesis takes place between 4 and 20 hours at 30°C. In the absence of methionine, DNA synthesis is depressed (as was observed previously after growth in glucose medium). However, in this case the difference still increases after 3 hours.

Experiments with phenethyl alcohol, presented in figures 6A and 6B, offer an interpretation of these kinetics in terms of initiations. Bacteria are grown with casamino acids, shifted for 2 hours to 40°C in the same medium and returned to glucose medium at 30°C with or without methionine. Phenethyl alcohol treatment is performed as for figure 4. Figure 6B shows that methionine starvation not only suppresses the wave of extra-initiations, but also reduces significantly the rate of initiation of the long-lasting synthesis.

CsCl gradient of residual DNA

In order to determine the degree of methylation of the DNA synthesised after return to 30°C, strain CRT 266 was grown at 30°C in light M63 glucose medium supplemented with casamino acids and DNA was labelled with both ^{14}C thymine and ^{3}H methionine.

The culture was transfered to 40°C and kept for 2 hours at this temperature. Afterwards the culture was filtered, washed with pre-

warmed salt minimal medium and resuspended in ^{15}N minimal M63 medium supplemented with deuterated glucose. The suspension was divided into two parts, one of which received threonine and leucine (40 µg/ml) and the other methionine at the same specific activity as before. Cultures were stopped after 20 hours and the DNA was extracted as indicated in Material and Methods. Another sample, withdrawn just before the period at 40°C, served as a control. DNA was centrifuged and collected as indicated in "Materials and Methods". Figure 7A shows the gradient profile obtained from the exponential phase. The total radioactive thymine corresponds to 3.0 µg DNA. The $^{3}H/^{14}C$ ratio is equal to 0.7, and, as expected, is constant. Figure 7B shows the profile of the DNA obtained after threonine + leucine starvation. The total radioactivity corresponds to 22 µg DNA. The isotope ratio is identical to the control in the lightest part of the peak and slightly lower in the heaviest region. This difference may reflect a small error in the estimation of the methionine content of casamino acids (see Methods). If this small variation is neglected, the gradient shows an almost identical yield of methylation. Figure 7C shows the profile of the DNA obtained after methionine starvation. As in figure 7B only one peak of DNA (17.5 µg) is observed. The methyl/thymine ratio is 0.45 in the lightest part of the peak, approximately half that of the control, as would be expected for hybrid DNA. The ratio falls abruptly in the heaviest part of the peak, indicating the presence of un- or hypomethylated DNA on both strands.

In this experiment, "heavy" and "hybrid" DNA's were separated by 4.5×10^{-3} g/cm^3, as judged by mathematical decomposition using the $^{3}H/^{14}C$ ratios. One could suppose that light degradation products (from RNA?) contributed to the formation of the newly synthesized DNA during

amino acid starvation and/or that DNA was fragmented. To investigate the first hypothesis, the experiment was repeated under such conditions that degradation products would have the same isotopic composition as new precursors. Bacteria were grown in heavy M63 medium with excess deuterated glucose (1 °/₀₀) and light casamino acids (0.5 °/₀₀), transfered for 2 hours in light M63 medium to 40°C and returned to 30°C in light M63 medium without methionine. After isopycnic centrifugation performed as before, semi-methylated DNA was separated by 8×10^{-3} g/cm^3 from unmethylated DNA and peaks were only partially resolved. Thus degradation products play a limited role in the lack of resolution. To check the second hypothesis, another sample containing both unmethylated and semi-methylated DNA was purified batchwise with hydroxyapatite and sedimented in a 5 %-20 % sucrose gradient, with phage DNA as a marker. $^3H/^{14}C$ ratio was found constant along the gradient, indicating the lack of specific breackage of the unmethylated DNA. However the molecular weight at the peak was only 15×10^6 daltons. On the other hand, peak width in cesium chloride (Figures 7A, B, C) was greater when the culture grew for a longer time with tritium label. This observation presumably reflects the capacity of tritium decay to fragment the DNA and thus cause the bands to spread.

DISCUSSION

After dna B temperature-sensitive mutants have been exposed to high temperatures, they reinitiate a new round of replication when returned to 30°C (22,23, 26). In a detailed studed by Schwartz and Worcel, it appeared that 40 to 50 minutes at the non-permissive temperature were necessary to obtain an extra-initiation in all the cells if chloramphenicol was added on return to 30°C (22). A similar time is necessary to get one extra-initiation after thymine starvation in Escherichia coli 15 T^- (18). If, on the other hand, the cells were allowed 15 minutes protein synthesis after the non-permissive period, then 10 to 15 minutes at 40°C were found to be sufficient for a subsequent extra-initiation. Worcel observed that, under such conditions, DNA synthesis resumes very slowly, only 2 % of the genome being replicated in the first 15 minutes. This slow resumption was attributed to the restoration of polymerase activity.

Kinetic experiments presented in this paper show that the reversion of the dna B mutational effect, as judged by the kinetics of DNA synthesis in the presence of chloramphenicol, is fast (4-5 minutes). A further delay observed in the kinetics of DNA synthesis in the absence of chloramphenicol results from the completion of the synthesis of initiation proteins. From these kinetics it is possible to measure the duration of the chloramphenicol-sensitive step preceding extra-initiation. The value obtained -17 minutes at 40°C- agrees well with the determination of the beginning of this step at 21 minutes before extra-initiation in Escherichia coli B/r at 37°C (26). It is also consistent with a 21 minute DNA resting period in exponentially growing cells of the same strain (4).

reported here show that residual synthesis in the presence of chloramphenicol and methionine increases with time at 40°C and reaches much higher values (+ 400 %) than postulated for one reinitiation, even if regarded as symmetric (+ 190 - 230°/o). The data are consistent with a recovery of the DNA/cell mass ratio characteristic for exponentialy growing cells after treatment with chloramphenicol (2), provided that the time at 40°C does not exceed 2 hours. After about 150 minutes at 30°C DNA synthesis continues slowly for several hours. This extends to the CRT 266 mutant the observation made by Kogoma and Lark (8) that strain CR 34 ^{ts} DNA 69 isolated by Bonhoeffer (1), is able to synthetise DNA for many hours after a temperature shift in the presence of thymine. Such long lasting synthesis has also been reported after thymine starvation (8).

Methionine deprivation after the non-permissive period leads to a decrease of the residual synthesis as compared to the control with methionine. This effect of methionine starvation presents precise characteristics :

- It appears after 30-45 minutes and is maximal after 150 minutes. It is minimal in conditions expected to allow the accumulation of degradation methionine with in the cell (21, 23). If reuse of protease products is permitted, it is maximal and the difference in DNA synthesis represents about the equivalent of one chromosome.

3 hypotheses can account for this difference :

i) Restriction of unmethylated DNA

ii) Non-replicability of semi-methylated DNA and

iii) effect of methionine on extra-initiations.

The restriction hypothesis assumes that unmodified DNA can be

Degradation of unmodified DNA *in vivo* has been observed in strains of *Escherichia coli* carrying strain 15 specific, phage P1, or Resistance factor N3 plasmids.

The corresponding restriction endonucléases that have been characterized have no absolute requirement for S-Adenosyl methionine. On the other hand, no such degradation is observed in strains carrying the K host specificity system (8, 11) and this resistance to restriction must be related to the absolute requirement of the R.K. endonuclease for S-adenosyl methionine *in vitro* (16). Thus, DNA restriction is unlikely to occur under our conditions. Furthermore, it would be hard to explain the existence of an unaffected long-lasting synthesis in the absence of methionine if DNA is degraded.

The second hypothesis is supported by the observation of C. Lark, that, if methionine is replaced by ethionine or norleucine in a Met^- strain, the DNA content doubles and then remains constant under restrictionless conditions (10). This suggest that formation of DNA unmethylated on both strands is prohibited. Under our conditions, it would be necessary to postulate further that the inability to synthesise unmethylated DNA is transient in order to account for the high residual increases ultimately obtained without methionine. In this case, one would expect DNA increments in the presence of phenethyl alcohol to be blocked temporarily once the "+ 100 % barrier" is reached. The results indicate that there is no such temporary block, and that the rounds are completed within 3 hours with or without methionine.

The third hypothesis, which we favour, considers that methionine is involved in some mechanism taking place after the synthesis of

phenethyl alcohol indicates that the lack of methionine suppresses the extra-initiation whereas it has little or no effect on initiation of the long-lasting synthesis. In addition, the absolute difference in residual syntheses corresponds to one chromosome, which is also consistent with the suppression of one extra-initiation if regarded as asymmetric. Both rifampicin (9) and streptolydigin (12) have been shown to block normal initiations of the chromosome of Escherichia Coli, and the properties of these inhibitors in vitro, fairly indicates the involvment of DNA-dependant RNA polymerase in initiation (12).

Lark (12) showed that rifampicin and streptolydigin suppress the extra-initiation following thymine starvation but have no effect on the long-lasting synthesis in strain 15T⁻. Thus from the similarity between the effect of methionine starvation and RNA transcription inhibition, it is tempting to consider that methionine-or a methionine derivative - participates in the process of primer RNA formation or activation.

Enrichment of the medium by addition of free amino acids before and during the phase at 40°C leads to an increase of the residual synthesis in glucose medium with as well as without methionine.

This increase is the combination of two effects :

1) The increase of the number of replicating forks per cells in casamino acid medium before the phase at 40°C, and 2) the increase of initiating proteins, as seen when casamino acids are added only during the phase at 40°C. From kinetic evidence, it is likely that these effects play an important role in the long-lasting accumulation of DNA.

In order to determine the degree of methylation of the DNA

ducts were performed after double labelling of the cells with ^{14}C thymine and ^{3}H methionine. Results show clearly that the DNA made in the absence of methionine is poorly methylated if at all. Thus, full methylation of the DNA is not a prerequisite for its replication. This result contradicts the hypothesis of C. Lark on the role of methylation in DNA replication. However, our results can be reconciled with this hypothesis if, as also considered by C. Lark (unpublished results, cited in reference 7), the only requirement for methylation in DNA replication comes from a few sites along the DNA.

A K N O W L E D G M E N T S

The author is deeply indebted to Jean-Marie DUBERT and Gérard BUTTIN for their continuous support and advice during the course of this work, and for help in the preparation of the manuscript. This study was made possible by grants of the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (70.02.270) and by the Commissariat à l'Energie Atomique.

Literature cited

1 Bonhoeffer, F. 1966. DNA transfer and DNA synthesis during bacterial conjugation. Z. Vererbungslehre 98 : 141-149.

2 Donachie, W. D., D. G. Hobbs, and M. Masters. 1968. Chromosome replication and cell division in Escherichia coli 15 T after growth in the absence of DNA synthesis. Nature (London) 219 : 1079-1080.

3 Brockes, J. P., P. R. Brown, and K. Murray. 1972. The deoxyribonucleic acid modification enzyme of bacteriophage P1. Purification and properties. Biochem. J. 127 : 1-10.

4 Cooper, S., and C. E. Helmstetter. 1968. Chromosome replication and the division cycle of Escherischia coli B/r. J. Mol. Biol. 31, 519-540.

5 Gordon, W. G., W. F. Semmet, R. S. Cable and M. Morris. 1949. Amino acid composition of α Casein and β Casein. J. Amer. Chem. Soc. 71, 3293-3297.

6 Hirota, Y., A. Ryter, and F. Jacob. 1968. Thermosensitive mutants of Escherichia coli affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33 : 677-693.

7 Klein, A., and F. Bonhoeffer. 1972. DNA Replication. In:Annu. Rev. Biochem. 41 : 301-332.

8 Kogoma, T., and K. G. Lark. 1970. DNA replication in Escherichia coli : Replication in absence of protein synthesis after replication inhibition. J. Mol. Biol. 52 : 143-164.

9 Lancini, G., R. Pallanza, and L. G. Silvestri. 1969. Relationships between bactericidal effect and inhibition of ribonucleic acid nucleotidyl transferase by rifampicin in Escherichia coli K12. J. Bacteriol. 97 : 761-768.

10 Lark, C. 1968. Effect of the methionine analogs, ethionine and norleucine, on DNA synthesis in Escherichia coli 15 T. J. Mol. Biol. 31 : 401-414.

11 Lark, C., and W. Arber. 1970. Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. XIII. Breakdown of cellular DNA upon growth in ethionine of strains with r_{15}^+, r_{P1}^+ or r_{N3}^+ restriction phenotypes. J. Mol. Biol. 52 : 337-348.

12 Lark, K. G. 1972. Evidence for the direct involvment of RNA in the initiation of DNA replication in Escherichia coli 15 T⁻. J. Mol. Biol. 64 : 47-60.

13 Lark, K. G., and C. Lark. 1966. Effect of phenethyl alcohol on the chromosome replication cycle. J. Mol. Biol. 20:9-19.

14 Lautenberger, J. A., and S. Linn. 1972. The deoxyribonucleic acid modification and restriction enzymes of Escherichia coli B. I. Purification, subunit structure, and catalytic properties of the modification methylase. J. Biol. Chem. 247 : 6176-6182.

15 Masker, W. E. and H. Eberle. 1972. Effect of phenethyl alcohol on deoxyribonucleic acid-membrane association in Escherichia coli. J. Bacteriol. 109 : 1170-1174.

16 Meselson, M., and R. Yuan. 1968. DNA restriction enzyme from Escherichia coli. Nature (London) 217 : 1110-1114.

17 Meselson, M., R. Yuan, and J. Heywood. 1972. Restriction and modification of DNA. Annu. Rev. Biochem. 41 : 447-466.

18 Pritchard, R. H., and K. G. Lark. 1964. Induction of Replication by Thymine starvation at the chromosome origin in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 9 : 288-307.

19 Ricard, M., and Y. Hirota. 1969. Effet des sels sur le processus de division cellulaire d'Escherichia coli. C. R. Acad. Sci. Paris 268 : 1335-1338.

20 Ryter, A., F. Jacob, F. Cuzin and M. Kohiyama. 1966. Thermosensitive mutants of Escherichia coli K12. I. Isolation and rapid characterization. Ann. Inst. Pasteur 110 : 465-486.

21 Schlessinger, D., and F. Ben Hamida. 1966. Turnover of protein in Escherichia coli starving for nitrogen. Biochim. Biophys. Acta 119 : 171-182.

22 Schwartz, M., and A. Worcel. 1971. Reinitiation of chromosome replication in a thermosensitive DNA mutant of Escherichia coli. II. Synchronization

23 Stein, G., and P. Hanawalt. 1969. Initiation of DNA replication cycles in Escherichia Coli following DNA synthesis inhibition. J. Mol. Biol. 46 : 135-144.

24 Sussman, A. J., and C. Gilvard. 1969. Protein turnover in amino acid-starved strains of Escherichia coli K12 differing in their ribonucleic acid control.
J. Biol. Chem. 244 : 6304-6308

25 Ward, C. B., and D. A. Glaser. 1969. Analysis of the chloramphenicol sensitive and chloramphenicol-resistant steps in the initiation of DNA synthesis in Escherischia coli B/r. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64 : 905-912.

26 Worcel, A. 1970. Induction of chromosome re-initiations in a thermo-sensitive DNA mutant of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 52 : 371-386.

TABLE 1 - RESIDUAL SYNTHESIS WITH AND WITHOUT METHIONINE FOR SEVERAL CONDITIONS OF PROTEIN SYNTHESIS BLOCK.

Control Culture Conditions	Maximal Residual synth. (%)	Test culture conditions	Maximal Residual synth. (%)	Maximal difference (%)	Time of divergence (min)	Time of maximal difference (min)
+Met-TL	220% at 3hr	-Met+TL	143% at 3hr	77 %	50	160
+Met-TL	257% at 4hr	-Met-TL	177% at 4hr	80 %	40	170
+Met+Chl	400% at 18 hr	-Met+Chl	362% at 18 hr	38 %	45	180
+Met+Chl	283% at 18 hr	-Met+Et+chl	230% at 18 hr	56 %	30	150

Abbreviations used :

Met : Methionine ; T : Threonine ; L : Leucine ; Chl : Chloramphenicol ; Et : Ethionine.

TABLE II - INFLUENCE OF GROWTH MEDIUM ON RESIDUAL SYNTHESIS AFTER 20 HOURS OF RESIDUAL SYNTHESIS AT 30°C IN THE PRESENCE OF CHLORAMPHENICOL

Casamino acids						
Before Shift to 40°C	During period of 40°C	After return to 30°C	Residual Synthesis after 20 hr at 30° C	Incorporation/ Optical density ratio before shift up	Incorporation/ Optical density ratio at the plateau	Ratio increase
-	-	-	+ 369 %	17,5	28	1.6
-	+	-	+ 703 %	17,5	34	1.9
+	+	-	+ 890 %	13,8	33,7	2.44
+	+	+	+ 1136 %	NT	NT	NT

L E G E N D S

Figure 1 : Kinetics of the resumption of DNA synthesis after various times at 40°C

A : Exponentially growing cells were transfered to 40°C at time zero and ^{14}C thymine (0.5 µCi/ml) was added after 5 minutes. Samples of the culture were returned to 30°C after 10, 20, 30, 40 and 60 minutes at 40°C. Radioactive incorporation was measured 0, 5, 10, 15, 20 and 25 minutes after the return to 30°C in the presence (solid lines) or absence (dashed lines) of 200 µg/ml chloramphenicol. Long-dashed baseline represents the incorporation at the non-permissive temperature. The mean difference between the experimental points and the indicated curve is 13 cpm.

B : Plot of the rates of incorporation with (solid line) or without (dashed line) chloramphenicol as a function of the time at 40°C.

Figure 2 : Residual DNA synthesis as a function of the time at 40°C.
Exponentially growing cells in glucose medium with ^{14}C thymine (0.25 µCi/ml) were transfered to 40°C at time zero. At times indicated on absiss samples were returned to 30°C with 200 µg/ml chloramphenicol. DNA synthesised in the 3 following hours is expressed in percent of the amount of DNA present at non permissive temperature.

Figure 3 : Kinetics of residual incorporation after growth in glucose medium
Exponentially growing cells in glucose medium with ^{14}C thymine (0.25 µCi/ml) were transfered for two hours at 40°C, filtered at time zero and resuspended in glucose medium at 30°C with the ^{14}C thymine and the following additions :

+ Methionine + threonine + leucine + chloramphenicol : ——— +

- methionine + threonine + leucine + chloramphenicol + ethionine (0.4 mg/ml) / – – – – •

Figure 4 : Effect of phenethyl alcohol at 0.25 % on residual synthesis after growth in glucose medium.

Exponentially growing cells in glucose medium with ^{14}C thymine (0.25 µCi/ml) were transfered for two hours at 40°C then filtered at time zero and resuspended in glucose medium at 30°C with ^{14}C thymine and the following additions

+ methionine -threonine -leucine : ——— +

- methionine +threonine +leucine : – – – – •

At times indicated on abscissa, samples were withdrawn, made 0.25 % with respect to phenethyl alcohol and further incubated for 3 hours.

A : Incorporation at the moment of addition of phenethyl alcohol

B : Incorporation at 3 hours after the addition of phenethyl alcohol

Figure 5 : Kinetics of residual incorporation after growth in casamino acids medium for 3 conditions of protein arrest at 30°C.

Exponentially growing cells in glucose medium + casamino acids (2°/₀₀) and ^{14}C thymine (0.25 µCi/ml) were transfered for two hours at 40°C. At time zero one part was returned to 30°C with 200 µg/ml chloramphenicol (——— ▲). Another part was filtered and resuspended in glucose medium with ^{14}C thymine and the following supplements : +methionine -threonine -leucine : ——— + ; -methionine +threonine +leucine : – – – – •

Figure 6 : Effect of phenethyl alcohol at 0.25 % on residual synthesis after growth in casamino acids medium.

Exponentially growing cells in glucose medium + casamino acids (2°/₀₀) with ^{14}C thymine (0.25 µCi/ml) were transfered for two hours at 40°C then filtered at time zero and resuspended in glucose medium at 30°C with ^{14}C thymine and the following additions :

+ methionine -threonine -leucine : ——— +

- methionine + threonine +leucine : - - - •

At times indicated on abscissa, samples were withdrawn, made 0.25 % with respect to phenethyl alcohol and further incubated for 3 hours.

A : Incorporation at the moment of addition of phenethyl alcohol

B : Incorporation at 3 hours after the addition of phenethyl alcohol.

Figure 7 : Sedimentation equilibrium gradients of doubly labelled DNA from strain CRT 266 after residual synthesis with or without methionine.

Cells were grown with glucose (2°/₀₀) and casamino acids (2°/₀₀) with ^{14}C thymine (0.25 µCi/20µg/ml) and ^{3}H methionine (25 µCi/20µg/ml), transfered for two hours to 40°C, filtered and resuspended at 30°C in ^{15}N medium with deuterated glucose and ^{14}C thymine.

A : DNA from culture just before growth at 40°C.

B : DNA from culture after a 20 h period of residual synthesis at 30°C + ^{3}H methionine - threonine - leucine.

C : DNA from culture after a 20 h period of residual synthesis at 30°C -methionine + threonine + leucine.

Segments represent the scale for a 10 mg/ml density variation in the linear part of the gradient.

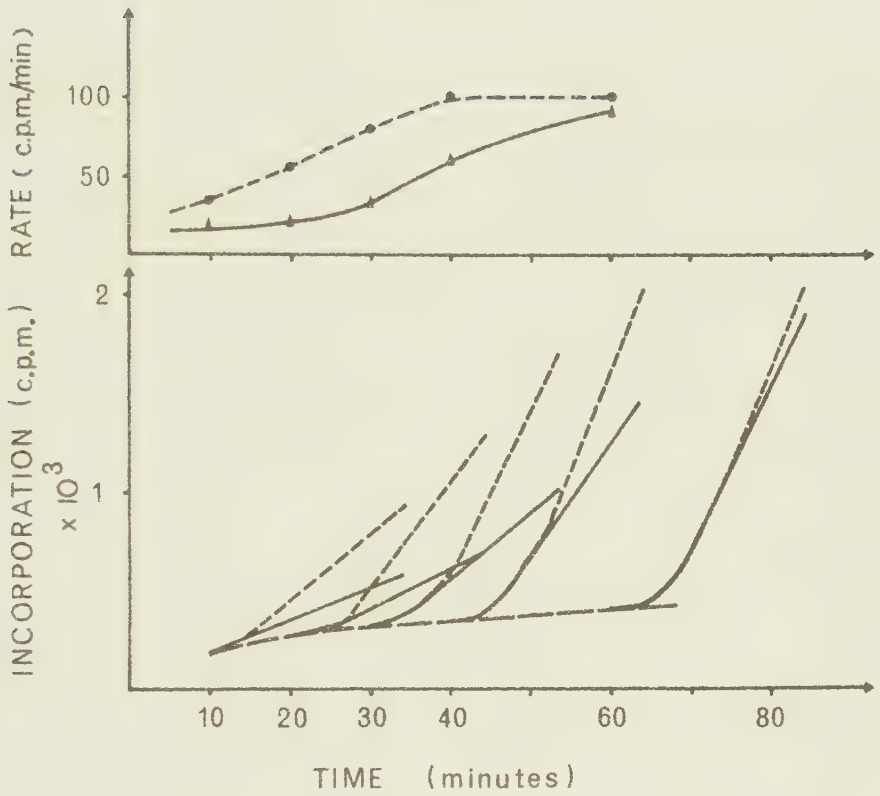

RATE (c.p.m./min)
100
50
INCORPORATION (c.p.m.)
x 10^3
2
1
10
20
30
40
60
80
TIME (minutes)

FIGURE 1

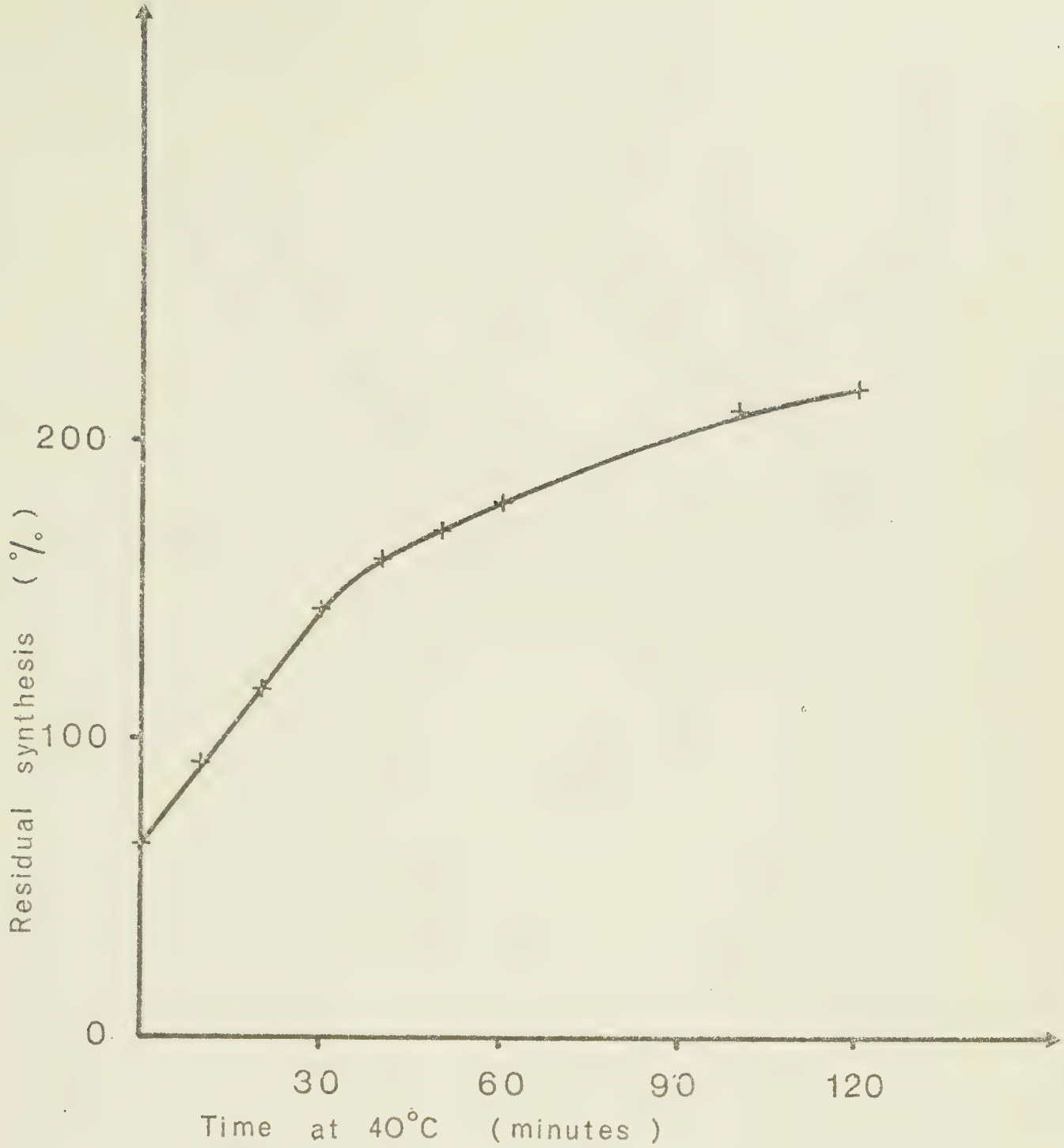


FIGURE 2

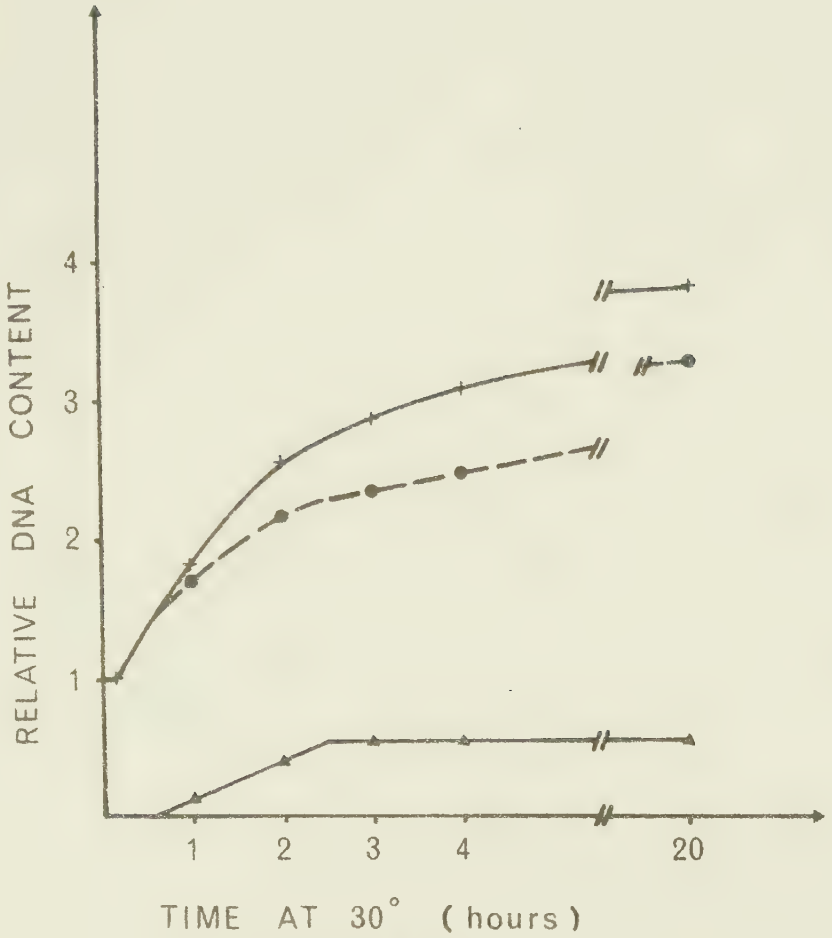


FIGURE 3

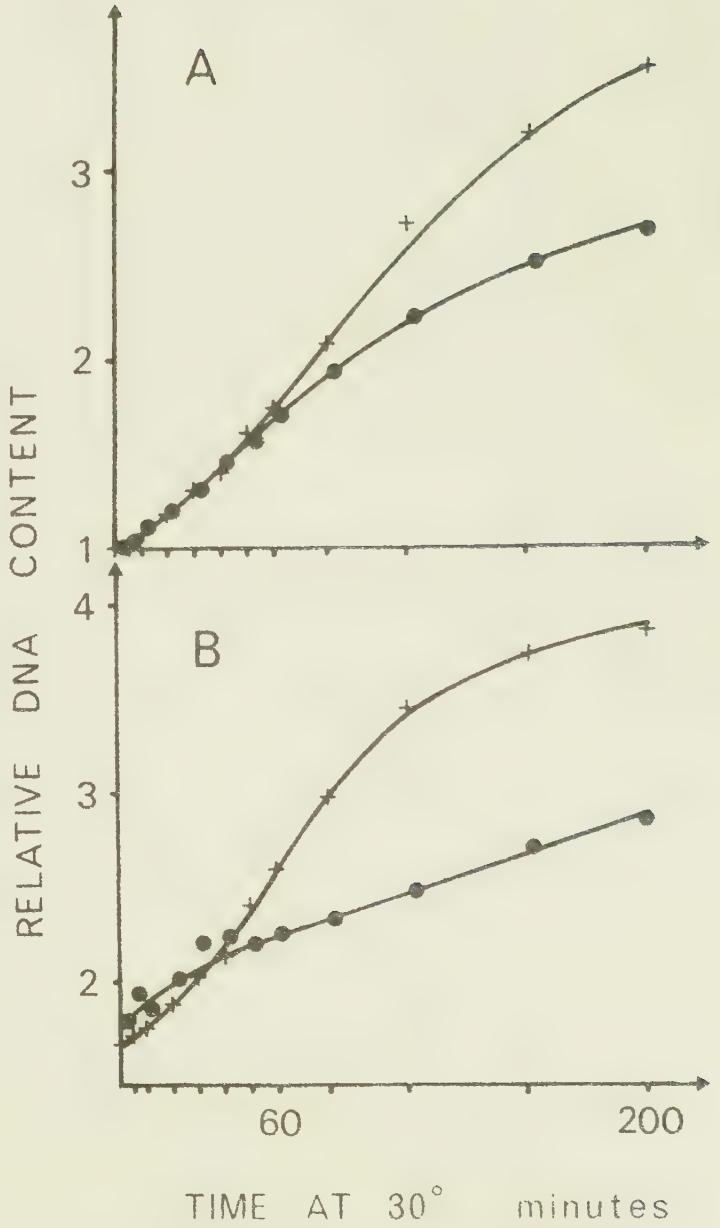


FIGURE 4

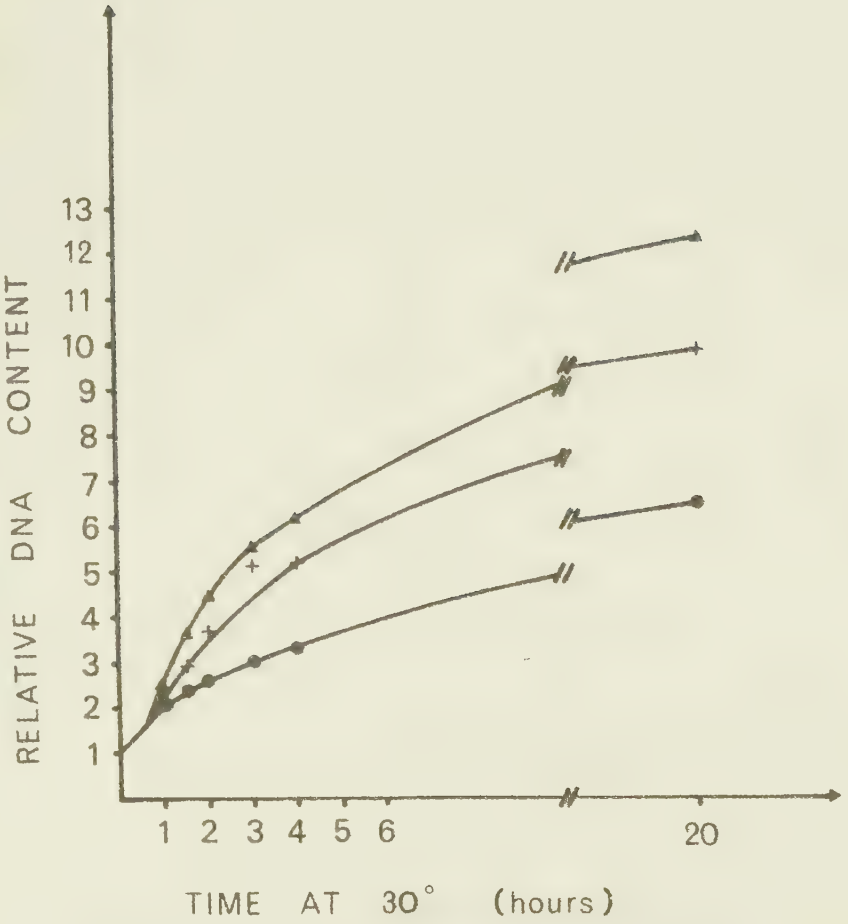


FIGURE 5

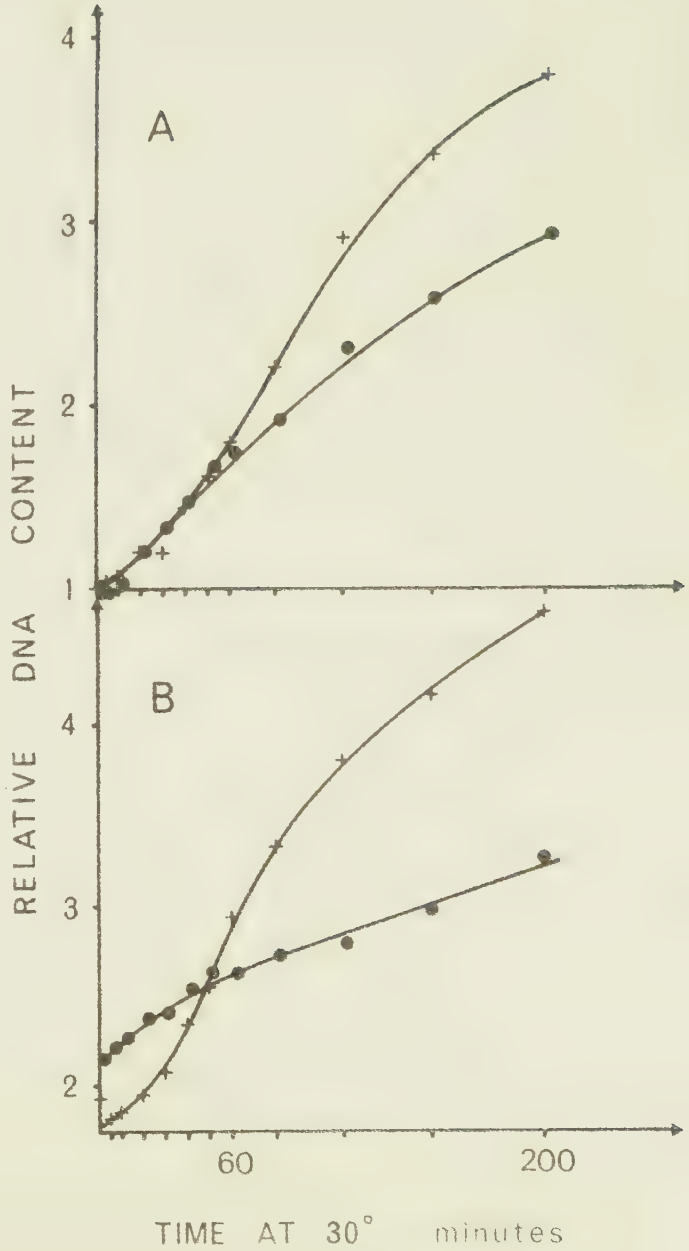


FIGURE 6

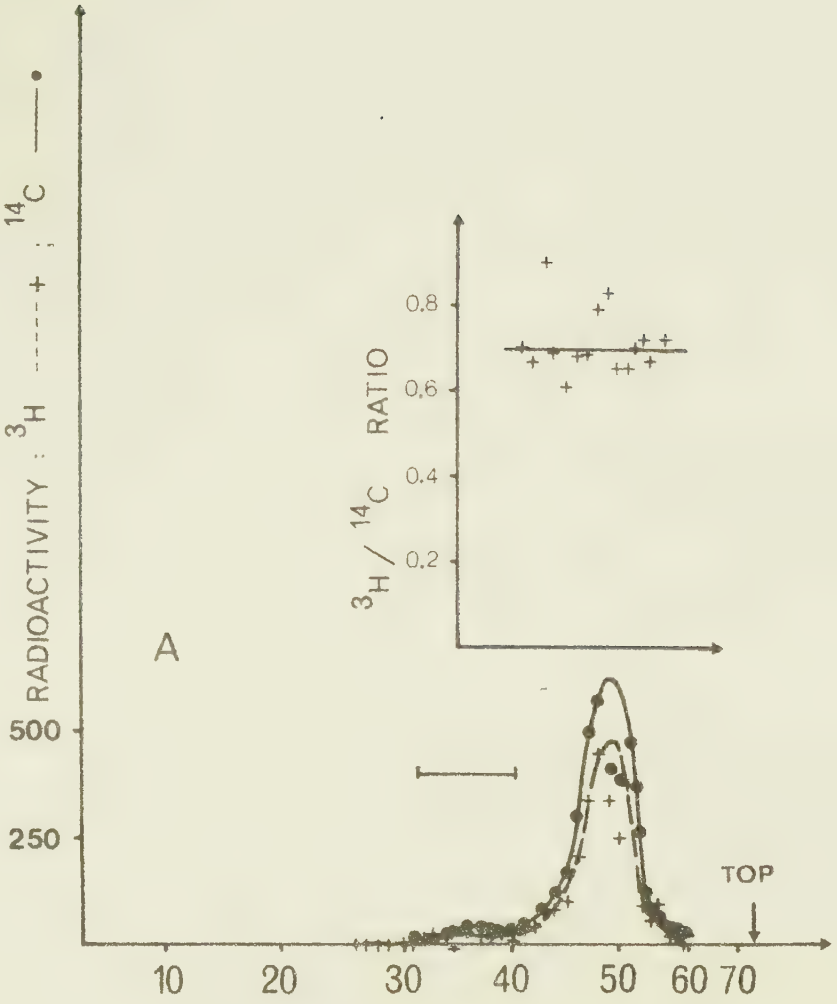


FIGURE 7

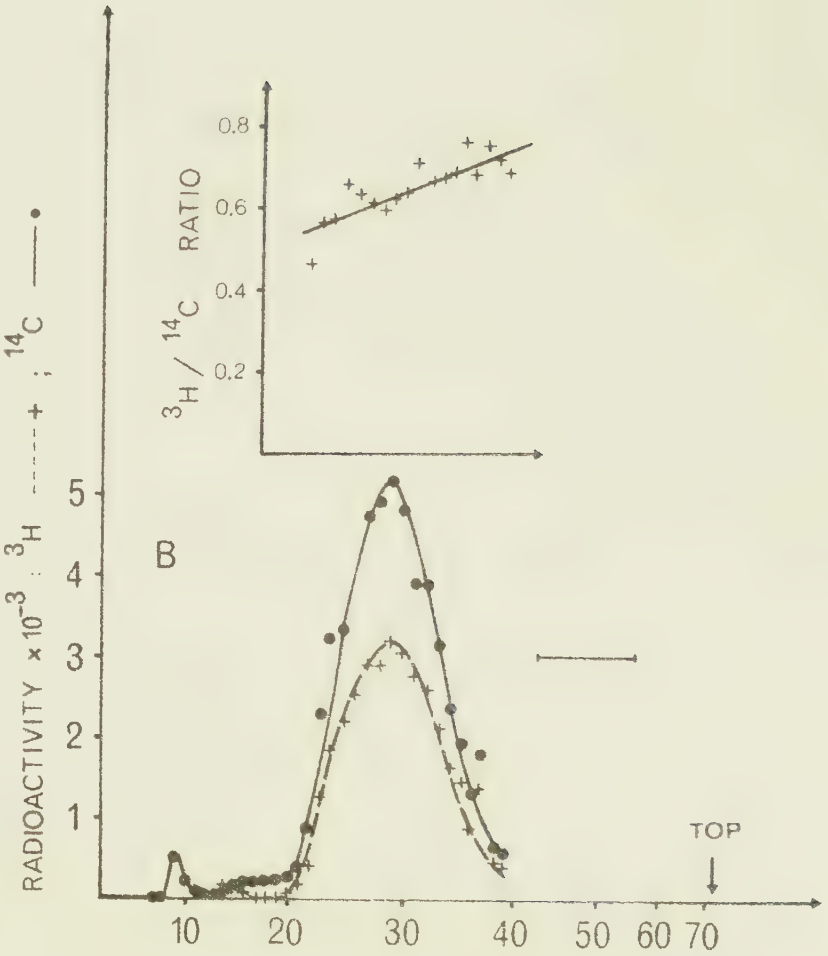


FIGURE 7

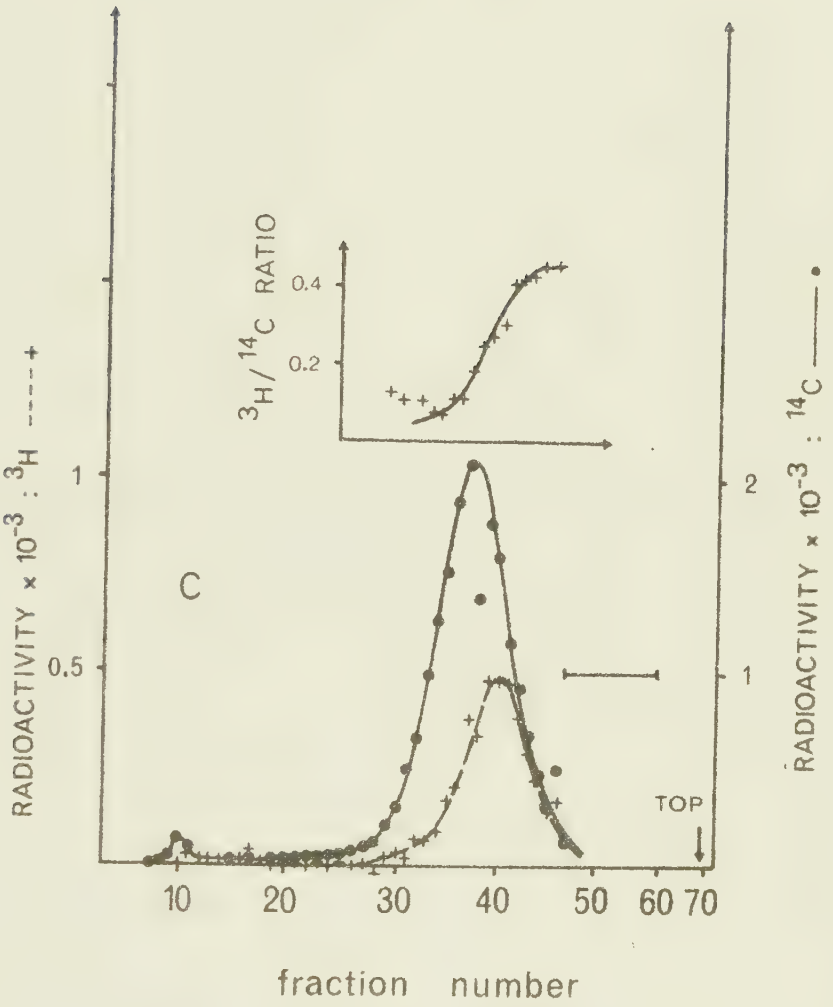

RADIOACTIVITY × 10⁻³ : ³H ----+
RADIOACTIVITY × 10⁻³ : ¹⁴C —— •
³H/¹⁴C RATIO
0.4
0.2
1
0.5
2
1
C
TOP
10
20
30
40
50
60
70
fraction number

FIGURE 7

METHYLATION ET RESTRICTION *IN VITRO* D'UN ADN NON METHYLE ISOLE D'*ESCHERICHIA COLI* K_{12}

4 - 1 : INTRODUCTION.

4 - 2 : MATERIEL ET METHODES.

4-2-1 : Préparation des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ (1).

4-2-1-1 : Souches et milieux.

4-2-1-2 : Préparation des bactéries carencées.

4-2-1-3 : Purification des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$.

4-2-2 : Préparation de l'ADN non modifié marqué.

4-2-3 : Préparation des enzymes.

4-2-3-1 : Endonucléase *Eco*K (2).

4-2-3-2 : Autres enzymes.

4-2-4 : Détermination des taux de méthylation in vitro.

4 - 3 : CARACTERISTIQUES DES ADN $Ré_{0,5}$ ET $Ré_1$.

4-3-1 : Rendement, pureté et masse moléculaire.

4-3-2 : Méthylation in vitro.

4-3-3 : Dégradation in vitro par les endonucléases *Eco*K, Eco_{R1} et Hin_dII.

4-3-3-1 : Principe des expériences.

4-3-3-2 : Conditions expérimentales.

4-3-3-3 : Résultats.

4 - 4 : DISCUSSION.

4 - 5 : BIBLIOGRAPHIE.

Note (1) : $Ré_{0,5}$ pour "semi-résiduel" et R_1 pour "totalement résiduel"

Note (2) : Dans cette section, nous avons adopté la nomenclature employée par Boyer et coll. pour désigner les enzymes de modification et de restriction. Cette désignation comprend une abréviation du nom d'espèce (Ex. : *Hin* pour Haemophilus influenzae) suivie du nom de la spécificité d'hôte, et précédé de "endonucléase" ou de "méthylase".

4 - 1 : INTRODUCTION.

La spécificité des enzymes de méthylation générale peut-elle être commune -totalement ou partiellement- à celle des méthylases de modification ?

L'exemple de la cytosine méthylase et de la méthylase *Eco*$_{RII}$ (Hattman et coll., sous presse) montre qu'il peut en être ainsi. Le cas des mutants de l'adénine méthylase du bactériophage T2, pour lesquels apparait un recouvrement de spécificité vis à vis de la méthylase *Eco*$_{P1}$ (Hehlmann et Hattman, 1972), va dans le même sens. Enfin le fait que les mutants "leakys" de l'adénine méthylase de E. coli K sont aussi fonctionnellement affectés pour la restriction K (Marinus et Morris, 1973) et autorestricteurs (Morris, communication personnelle) suggere qu'une interférence des spécificités peut exister entre adénine méthylase et méthylase *Eco*K.

Nous avons abordé cette question par une méthode directe : Supposons deux ADN de même source, l'un non modifié (pour nulle spécificité d'hôte) mais ayant reçu les groupes méthyls de la méthylation générale, l'autre non méthylé. Si ce dernier ADN est plus dégradé in vitro par l'endonucléase d'un système donné que l'ADN non modifié, on peut conclure qu'il existe des spécificités communes (c'est à dire des séquences reconnues communes) à cette endonucléase et à la méthylase générale.

Cette comparaison est possible si l'on dispose d'un ADN totalement non méthylé d'assez haute masse moléculaire. Nous avons montré antérieurement que le mutant dna B CRT 266 thermosensible pour l'élongation de l'ADN, synthétise un ADN non méthylé sur les deux brins dans certaines conditions (Bouché, 1973).

Nous décrivons ici l'isolement de cet ADN, ses caractéristiques de méthylation et de restriction in vitro par les endonucléases *Eco*K, *Eco*$_{RI}$ et *Hin*$_{d}$II comparée à celle d'un ADN non modifié d'Escherichia coli K.

4 - 2 : MATERIEL ET METHODES.

4-2-1 : Préparation des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ marqués :

4-2-1-1 : Souches et milieux :

La souche CRT 266 (Jacob et coll., 1966) a été utilisée pour la préparation de l'ADN non méthylé (voir section 3). Trois milieux différents sont utilisés pour la préparation des bactéries carencées en méthionine :

Milieu {1} : ^{15}N 63 B_1

Phosphate monopotassique	13,6	g/l.
$^{15}NH_4Cl$ (Azote et Produits chimiques)	1,65	g/l.
$MgSO_4$	200	mg/l.
$FeSO_4$	0,5	mg/l.
KOH qsp PH 7,2 et vitamine B_1.		
Glucose deutéré (I.C.N.)	1	g/l.
Casamino-acides (Difco)	0,5	g/l.
L tryptophane	20	mg/l.
L méthionine, L thréonine, L leucine	40	mg/l.
^{14}C Thymine (C.E.N.-S.C.K.) 0,5 mCi/	20	mg/l.

Milieu {2} :

63 B_1 +		
Glucose	2	g/l.
Casamino-acides	2	g/l.
L tryptophane	40	mg/l.
L méthionine, L thréonine, L leucine	80	mg/l.
^{14}C Thymine 0,2 mCi/	8	mg/l.

Milieu {3} :

63 B_1 +		
Glucose	2	g/l.
L thréonine, L leucine, L glutamine, L asparagine, L arginine	40	mg/l.
Adénosine, cytidine, guanosine	20	mg/l.
^{14}C Thymine 0,375 mCi/	15	mg/l.

4-2-1-2 : Préparation des bactéries carencées :

La souche CRT 266, conservée à -30° C dans le milieu 63 B_1 en présence de 10 % de glycérol, est d'abord cultivée à 30° C dans 5 ml de milieu {1}. Lorsque la densité optique de la culture atteint 0,4 à 600 nm, la culture est diluée dans 35 ml du même milieu, et cultivée à 30° C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,25 à 600 nm. Il importe que pendant cette première phase, la densité bactérienne soit largement limitée pour être sûr que le glucose et les aminoacides restent en large excès. Ensuite, la culture est passée sur filtre de nitrocellulose (ϕ = 47 mm, diamètre des pores 0,45 µm), lavée avec du milieu 63 B_1 préchauffé à 40° C et resuspendu immédiatement dans 25 ml de milieu {2} préchauffé à la même température. La culture est poursuivie avec agitation vigoureuse pendant 2 heures à 40° C. A la fin de cette période, elle est filtrée et lavée comme précédemment et resuspendue dans 25 ml de milieu {3} préchauffé à 30° C. La culture est ensuite poursuivie pendant 20 heures à cette température. Enfin, les bactéries sont lavées par centrifugation dans le tampon Tris-HCl 10^{-2} M, PH 7,5, EDTA 10^{-4} M jusqu'à élimination de la radioactivité du surnageant.

4-2-1-3 : Purification des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ (1) :

Le protocole de la lyse des cellules, de la déprotéinisation et de la centrifugation à l'équilibre a été décrit (Bouché, 1973 ; section 3). Il est adapté en fonction de la quantité de bactéries à traiter. Pour l'obtention des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ à l'échelle préparative, des aliquotes sont recueillis à partir des gradients et leur radioactivité est mesurée. Les deux pics (pic léger $Ré_{0,5}$ et pic hybride $Ré_1$)sont ensuite dialysés séparément contre le tampon Tris-HCl 10 mM PH 7,5, EDTA 0,1 mM puis concentrés par dialyse contre une solution de polyéthylène-glycol 6000 à 30 % dans le même tampon et enfin redialysés contre ce tampon.

A ce stade de purification, les deux ADN se sont révélés totalement résistants à l'action prolongée des endonucléases *Eco*R_I et *Hin*$_d$II. Cette résistance ne disparaît pas après dialyse prolongée des ADN contre le tampon Tris-HCl 10^{-2} M, PH 7,5. La résistance n'est pas une propriété intrinsèque des ADN car dans des incubations mixtes avec une quantité

(1) $Ré_{0,5}$ pour "demi-résiduel", et $Ré_1$ pour "totalement résiduel".

égale d'ADN non modifié, ce dernier n'est pas dégradé contrairement au cas où il est incubé isolément avec les enzymes.

C'est pourquoi les deux ADN ont été repurifiés par chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite en présence de KCl 3 M (Bernardi, 1969). Une partie (≃ 60 %) du matériel absorbant à 260 nm est élué à de faibles concentrations de phosphate de K. Le reste est élué avec la radioactivité. La nature de l' (ou des) inhibiteur n'a pas été recherchée. Le pic de radioactivité est dialysé et concentré comme après les gradients de césium. Désormais, $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ se réfèreront à ces ADN repurifiés.

4-2-2 : Préparation de l'ADN non modifié marqué :

La souche 803₀, met, gal, lac, hssK (r_K^- m_K^-) (Wood, 1965) m'a été aimablement fournie par Mme Jacqueline George. A partir de cette souche, un dérivé thymine$^-$ a été préparé par sélection à la trimétoprim (OKADA et coll., 1961). Ce dérivé est cultivé dans 10 ml de milieu 63 avec du glucose (4°/₀₀), de la méthionine (50 µg/ml), de la désoxyadénosine (200 µg/ml) et de la thymidine tritiée (1,8 µCi/ 20 µg/ml). En fin de culture, l'ADN est extrait et purifié selon la même méthode que pour les ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$, excepté que la chromatographie sur hydroxyapatite est faite en batch et sans KCl. L'ADN est concentré dans un rotavapor, dialysé puis gardé à 4° C à une activité volumique de 300 000 cpm/ml.

4-2-3 : Préparation des enzymes :

4-2-3-1 : Endonucléase *EcoK*.

Pour le dosage de l'endonucléase *EcoK*, les ADN des bactériophages λ.O et λ.K ont été préparés et utilisés pour le test de rétention du complexe enzyme-ADN sur filtre.

Ces ADN ont été préparés, respectivement, à partir de la souche 803₀ et de la souche 704₀ (met$^-$, gal$^-$, lac$^-$, m_K^+ r_K^+, Wood, 1965). Dans un premier temps, des lysogènes pour le phage thermoinductible non lytique λ C_1 857 S7 ont été isolés. Ces souches lysogènes ont été cultivées à 30° C dans 250 ml de milieu 63 B_1 en présence de glucose et casaminoacides à 4°/₀₀, de méthionine à 100 µg/ml, de désoxyadénosine à 200 µg/ml et de thymidine tritiée à 0,5 µCi/ 5 µg/ml. Ils ont été induits en fin de

phase exponentielle par dilution dans un volume égal de milieu préchauffé à 55° C et différent du précédent par une concentration décuple de thymidine marquée. Après 4 heures les bactéries ont été lavées par centrifugation, lysées avec du chloroforme puis les phages ont été purifiés par centrifugation différentielle puis par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium. Les ADN ont été préparés par la méthode de déprotéinisation au phénol. Ces ADN, dont les activités spécifiques sont 1200 cpm/µg pour λ.K (λ.704) et 950 cpm/µg pour λ.0 (λ.803) ont servi respectivement comme ADN de contrôle et ADN de mesure pour le test de rétention spécifique du complexe enzyme-ADN sur filtre de nitrocellulose (Meselson et Yuan, 1970). Les conditions de test sont dérivées de celles décrites par Meselson et Yuan, d'une part, et par Boyer et coll. pour l'endonucléase *Eco*B (1971), d'autre part :

Le milieu d'incubation (250 µl) comprend Tris-HCl 0,1 M, PH 7,5 ; 2 mercaptoéthanol 6 mM ; $MgCl_2$ 4 mM ; EDTA 0,2 mM ; ATP 0,5 mM ; Ado-met 0,1 mM et les ADN de E. coli K_{12} non marqué (10 µg) et de λ.0 ou de λ.K tritié (environ 2µg). Dans certains contrôles, Ado-met est omis.

Après addition de l'enzyme, le mélange est incubé 2 minutes à 30° C puis dilué dans 2 ml de tampon F.B. Tris-HCl 10 mM PH 7,5 : KCl 10 mM ; EDTA 2 mM et diméthylsulfoxyde à 5 %. La dilution est ensuite filtrée sur un filtre Schleicher et Schull de nitrocellulose-esters bouilli dans l'eau distillée (diamètre des pores 0,45µm) à la vitesse de 1 ml/min. ; les filtres sont lavés avec 2 x 2 ml de tampon F.B., séchés et comptés.

Grâce à ce test, la purification de l'endonucléase *Eco*K, effectuée selon une méthode proche de celle employée par Meselson et Yuan (1968) a pu être suivie. L'enzyme a été préparé à partir de 65 g de bactéries de la souche MRW 25 (Endo 1^-). Après préparation d'un extrait à l'aide d'une presse de French, la méthode de Meselson et Yuan a été employée jusqu'à l'étape de chromatographie sur colonne de phosphocellulose inclue. Puis, l'éluat de cette chromatographie a été dilué trois fois dans le tampon phosphate de K 10^{-2} M PH 7, et amené ainsi à une concentration voisine de

7×10^{-2} M. Il a été appliqué sur une colonne de Biogel A 0,5 M (11 x 360 mm) surmonté par un disque de phosphocellulose (11 x 12 mm) équilibré avec le tampon phosphate de K 2×10^{-2} M PH 7,0 + Dithiothreitol 5×10^{-4} M. Après passage de l'échantillon et lavage de la colonne, le tampon phosphate de K 3×10^{-1} M PH 7 + Dithiothreitol 5×10^{-4} M a été appliqué. L'enzyme, que l'on détecte au niveau du volume d'exclusion, a été concentré par dialyse contre le tampon phosphate de K 10^{-1} M PH 7 + Dithiothreitol 5×10^{-4} M contenant 30 % de Polyéthylène glycol 6000, puis contre le même tampon contenant 50 % de glycérol. La fraction obtenue (environ 0,1 ml) possède une capacité de fixation de 9×10^{9} molécules d'ADN λ 803. par microlitre, entièrement Ado-met dépendante. Elle est conservée à -10° C.

4-2-3-2 : Autres enzymes :

L'endonucléase *Eco*$_{RI}$ purifié m'a été fournie par M. François Cuzin, que je remercie ici pour son offre. Grâce à Mme Héléna Kopecka, j'ai pu aussi éprouver l'endonucléase *Hin*$_{d}$II de Haemophilus influenzae. Ces deux enzymes sont dépourvus d'activité exonucléasique mesurable.

Les ADN méthylases de E. coli K_{12} ont été purifiées à partir de la souche MRW 25, endo 1^{-} (Bouché et Dubert, 1972) jusqu'au stade AS. Cette source d'enzyme est utilisée pour la méthylation in vitro des ADN Ré$_{0,5}$ et Ré$_{1}$.

4-2-4 : Détermination des taux de méthylation in vitro :

La détermination des taux de méthylation in vitro repose sur le même principe que celui employé par Arber et Küehnlein (1972) pour la mesure de la méthylation modificatrice de l'ADN du phage fd par la méthylase *Eco*B. L'ADN marqué est méthylé in vitro avec de la S-adénosyl méthionine tritiée. L'ADN doublement marqué ainsi obtenu est séparé de la S-adénosyl méthionine par filtration sur gel puis le rapport de marquage de l'ADN est mesuré. Le taux de méthylation est déduit des caractéristiques des précurseurs radioactifs.

Pour la mesure des taux de méthylation in vitro des ADN Ré$_{0,5}$ et Ré$_{1}$, le milieu d'incubation comprend dans 40 µl :

Tampon Tris-HCl 0,15 M, PH 8 ; 2-mercaptoéthanol 10 mM ; EDTA 1 m
ADN $Ré_{0,5}$ ou $Ré_1$: environ 1000 cpm soit ≈0,5 µg par 40 µl.
Ado-met tritiée à 2380 cpm/pM (CEA, France) : 1,1 x 10^{-5} M.
Fraction AS : 1 µl/40 µl (0,42 unités).

Après des temps variables d'incubation à 30° C, on prélève des échantillons de 12 µl qui sont dispersés dans 200 µl de tampon Glycine-NaOH 20 mM PH 9,5 + NaCl 0,3 M contenant 1 à 2 µg d'un ADN non marqué. Ce dernie ralentit la baisse de rendement consécutif à l'absorption de l'ADN marqué sur les parois du tube, sans entraîner d'autoabsorption notable du tritium. Le tube contenant la dilution est porté pendant 10 minutes à 65° C puis les 212 µl sont appliqués sur une colonne (9 x 120 mm) de Biogel P 10, 200-400 mesh faite dans le tampon Glycine-NaOH + NaCl, et le matériel est filtré sur cette colonne. Les fractions recueillies (0,8 ml) sont directement mélangées à 10 ml d'Instagel (Packard Instruments) et comptées dans un compteur à scintillation liquide avec les canaux appropriés pour le double marquage.

4 - 3 : CARACTERISTIQUES DES ADN $Ré_{0,5}$ ET $Ré_1$.

4-3-1 : Rendement, pureté et masse moléculaire.

La figure 1 montre que dans les conditions expérimentales décrites dans la section 4-2-1, les ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$ sont presque totalement séparés dans un gradient de chlorure de césium à l'équilibre. L'écar de densité entre les pics est de 10 mg/ml, donc deux fois plus grand que dans la méthode initiale (Bouché, 1973). On peut considérer que le gain d'écart de densité provient de deux facteurs :

a) La diminution de densité avec le passage d'un milieu lourd à un milieu léger est, ici, additive avec la diminution de densité résultant de l'absence des groupes méthyls, alors que dans la méthode initiale elle était soustractive. Ceci entraîne un gain correspondant à un peu moins de 1 % de groupes méthyls, soit 1 mg.ml (SZIBALSKI, 1968).

b) Lors de la première phase de croissance, les précurseurs lourds ^{15}N ($^{15}NH_4$ Cl) et ^{2}H (glucose deutéré) s'incorporent essentiellement dans le ribose et les bases de l'ADN et de l'ARN, tandis que les aminoacides

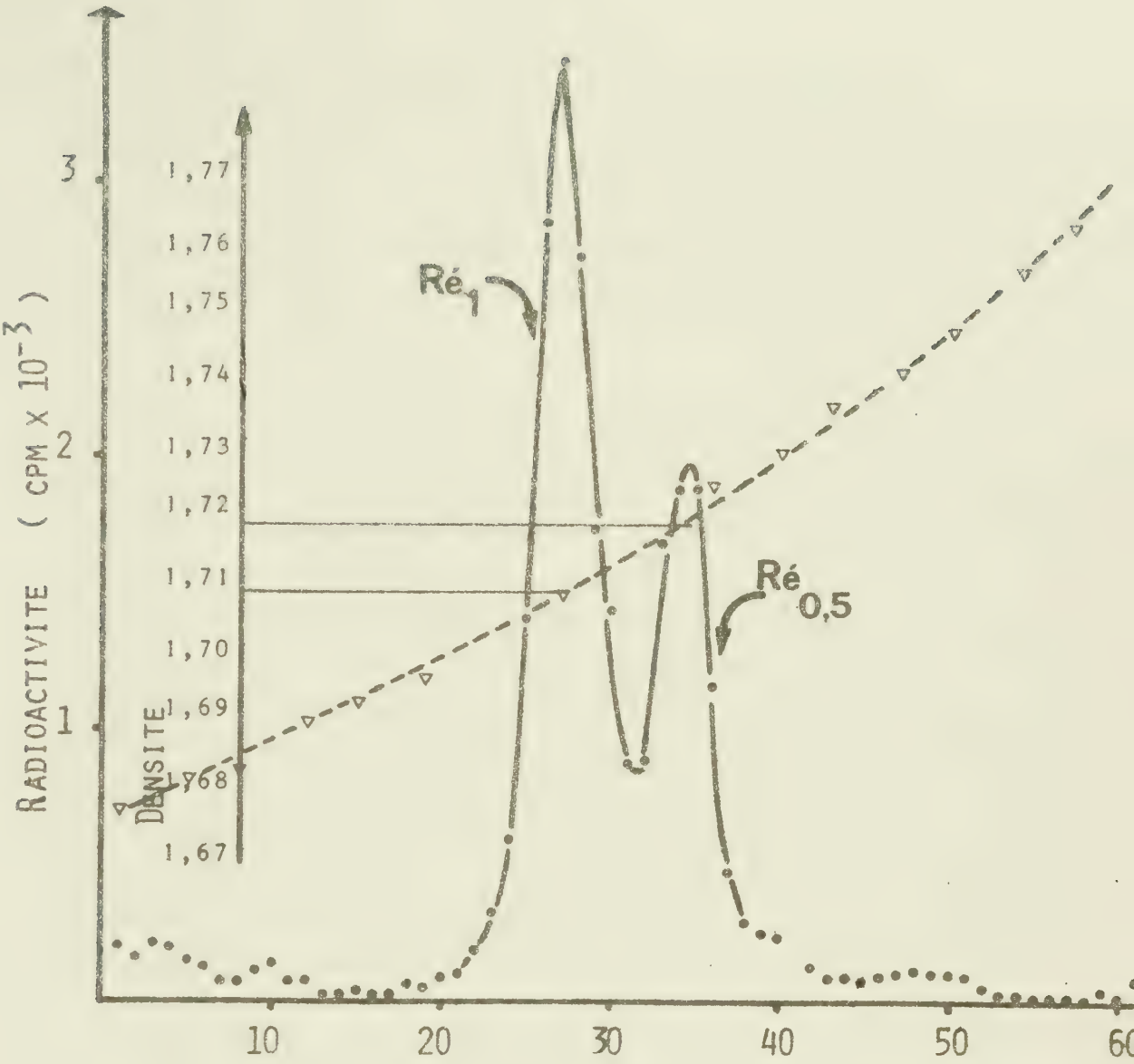


FIGURE 1 SEPARATION DES ADN $Ré_1$ ET $Ré_{0,5}$ SUR GRADIENT DE CHLORURE DE CESIUM.

Chaque gradient, contenant 60 µg d'ADN dans 25 ml de solution de CsCl à la densité initiale de 1,72 g/ml, est centrifugé pendant 65 heures à 20° C dans le rotor angulaire Spinco n° 30 à 23000 rpm. 61 fractions sont receuillies après injection d'un liquide dense au fond des tubes (Appareil ISKO)

———— : Radioactivité des fractions aliquotes

- - - - - : Densité des fractions

légers vont dans les protéines. Au cours de la deuxième phase, toute la synthèse de protéines et d'ARN se fait à partir de précurseurs légers. Par conséquent, il ne peut y avoir de compétition entre des pools de densité différente pendant la troisième phase de synthèse résiduelle. En revanche, la méthode utilisée initialement impliquait une densité différente des précurseurs provenant de la dégradation et du milieu pendant la troisième phase de 20 heures à 30° C.

Les deux ADN obtenus sont dans la proportion de 2 pour $Ré_1$ à 1 pour $Ré_{0,5}$. Ceci est en accord avec une multiplication par 6 de la quantité d'ADN pendant la phase sans méthionine (Bouché, 1973). Le rendement de la méthode est supérieur à 3 µg d'ADN $Ré_1$ par millilitre de culture en milieu ^2H ^{15}N.

Les ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$, avant leur chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite, sédimentés dans des gradients de saccharose avec l'ADN tritié du phage λ comme marqueur, ont des coefficients de sédimentation identiques et égaux à 60 S. Ceci correspond à une masse moléculaire de l'ordre de $1,5 \times 10^8$ daltons, tant d'après l'équation de Studier (1965) que d'après les exemples d'ADN linéaires viraux connus. Ceci confirme que les masses beaucoup plus faibles trouvées préalablement ne provenaient pas d'une dégradation de l'ADN par des endonucléases, mais vraisemblablement de la désintégration du tritium lors des doubles marquages in vivo.

4-3-2 : Méthylation in vitro des ADN $Ré_{0,5}$ et $Ré_1$.

Le fait de préparer un ADN de haute masse moléculaire par simple marquage ôte le contrôle interne que représentait le double marquage par la méthionine ^3H et la thymine ^{14}C in vivo dans les expériences précédentes. Il était donc nécessaire de vérifier le degré de méthylation des ADN obtenus par la méthylation in vitro à l'aide des enzymes homologues. La méthode employée est décrite dans la section 4-2-4. La figure 2 montre que la radioactivité du tritium exclue de la colonne de Biogel est bien dûe à une méthylation d'ADN. La saturation de l'ADN est obtenue en moins de 15 minutes, tant à 30° C (figure 3) qu'à 37° C. Connaissant les caractéristiques des préparations de thymine et de S-adénosyl méthionine marquée données par le fabriquant, on peut calculer que les plateaux

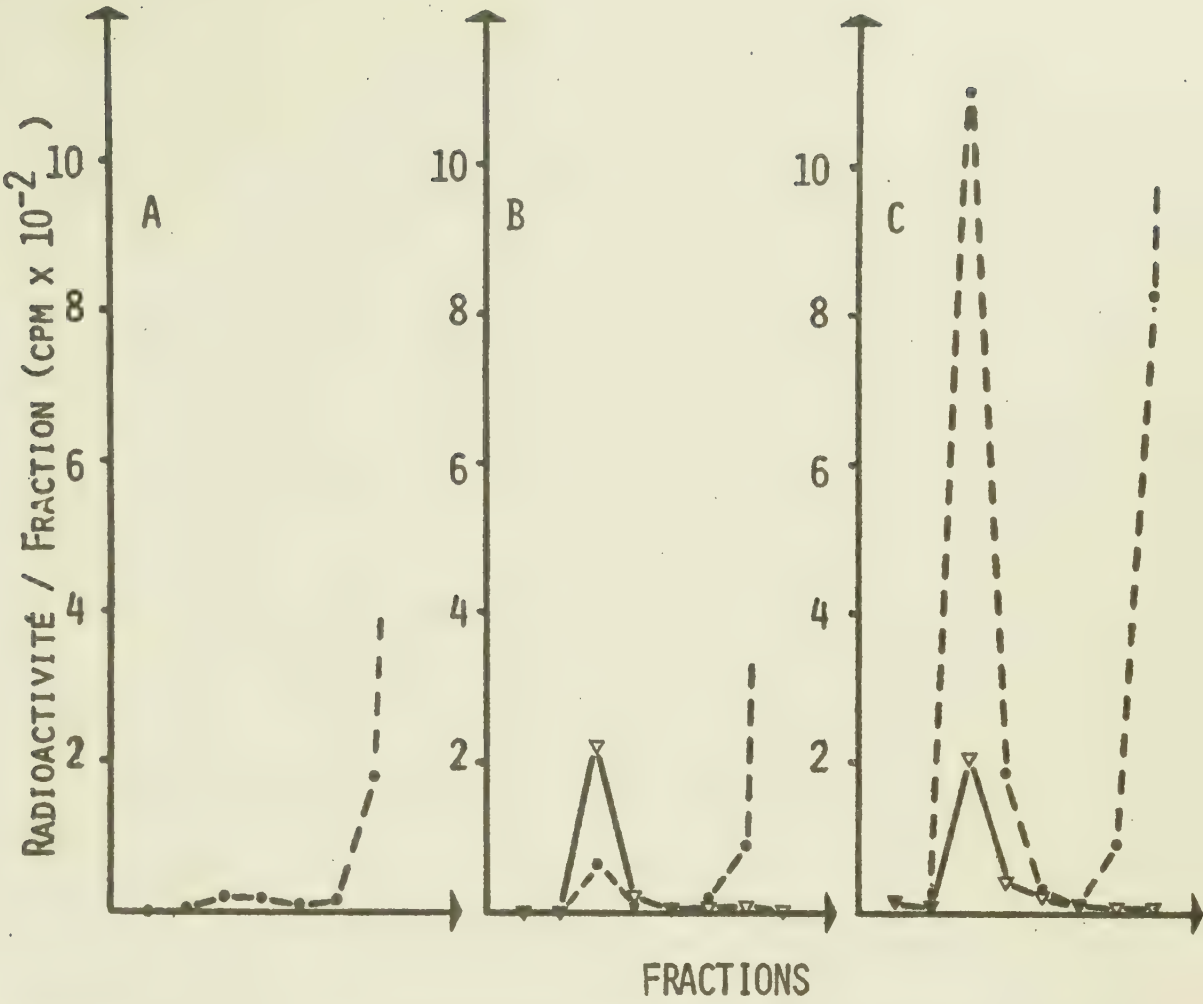


FIGURE 2 SEPARATION DE L'ADN SUR COLONNE DE BIOGEL P 10 APRÈS MÉTHYLATION IN VITRO.

Figure 2 A : Incubation sans ADN pendant 1 heure à 30° C

Figure 2 B : Incubation avec ADN $Ré_1$ pendant 0 minutes.

Figure 2 C : Incubation avec ADN $Ré_1$ pendant 1 heure à 30° C.

Les conditions de réalisation des milieux réactionnels, d'incubation et de filtration sur Biogel P 10 sont décrites dans le texte.

——— ▽ : Radioactivité ^{14}C (ADN)

- - - - - • : Radioactivité ^{3}H (méthylation)

La remontée à droite de chaque courbe représente le début du pic d'élution de la S-adénosyl méthionine.

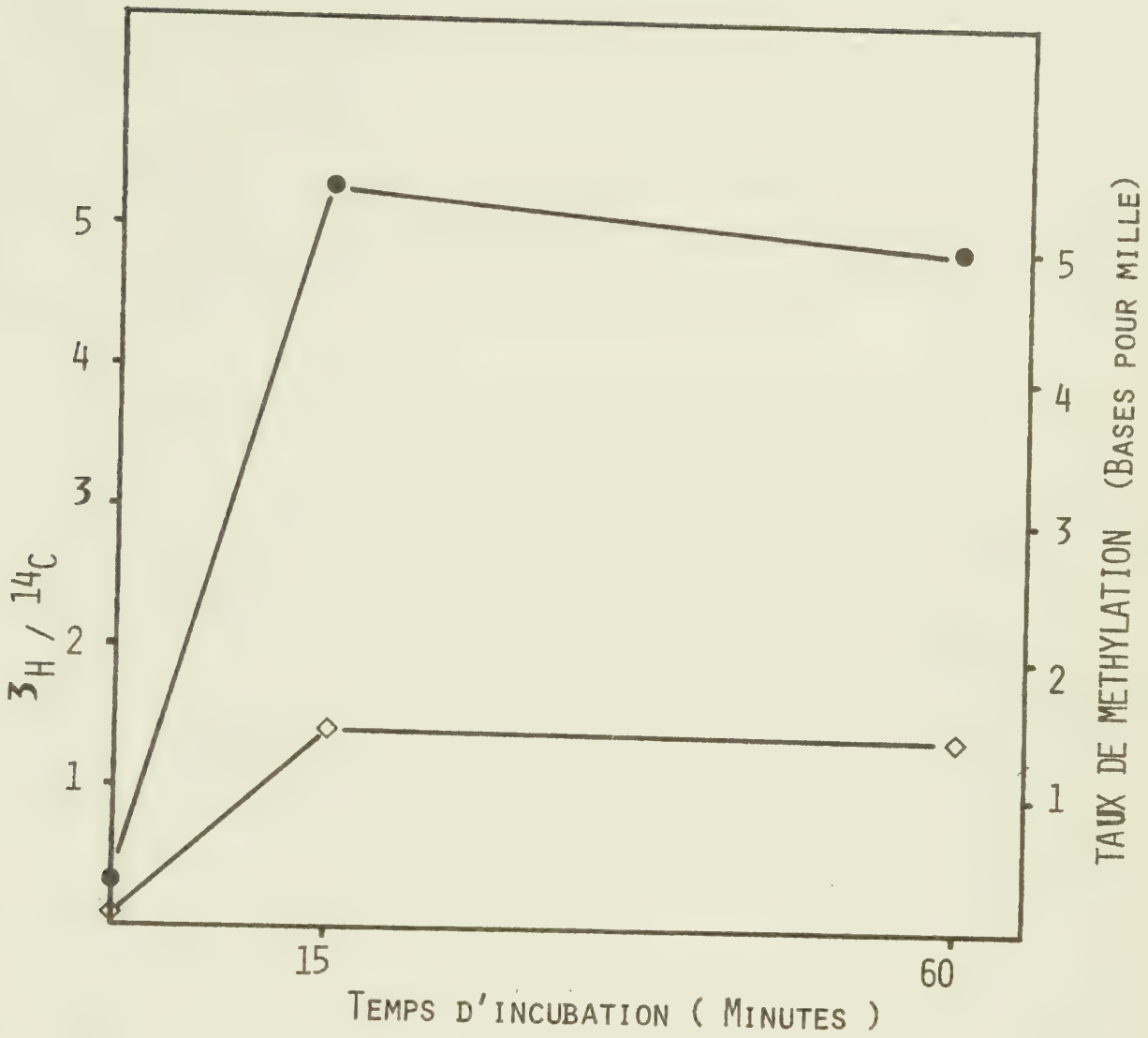


FIGURE 3 MÉTHYLATION DES ADN RE_1 ET $RE_{0,5}$ IN VITRO

(Voir les explications dans le texte)

● : Méthylation de l'ADN $Ré_1$

◇ : Méthylation de l'ADN $Ré_{0,5}$

correspondent à la méthylation de 0,5 et 0,15 % des bases pour les ADN $Ré_1$ et $Ré_{0,5}$, respectivement. La première valeur est du même ordre que celles fournies par différents auteurs pour le taux de méthylation de l'ADN de E. coli K ou C in vivo. Ces valeurs, variables d'un auteur à l'autre, oscillant de 0,34 à 0,75 %, mais ce dernier nombre est vraisemblablement le plus proche de la réalité (Vanyushin et coll., 1968). Enfin, il faut noter que la méthylation de l'ADN $Ré_{0,5}$ n'a été que 28 % de celle de l'ADN $Ré_1$, et non les 50 % attendus.

4-2-3 : Dégradation par les endonucléases *EcoK*, *Eco*$_{RI}$ et *Hin*$_d$II.

4-3-3-1 : Principe des expériences.

Le principe de ces expériences est le suivant : Si un ADN de coefficient de sédimentation S_1 est soumis à l'action intensive d'une endonucléase, son coefficient de sédimentation final sera $S_2 < S_1$. Connaissant ces deux valeurs, on peut calculer le coefficient de sédimentation $S_{éq}$ qu'aurait un ADN de taille infiniment grande après avoir subi le même traitement enzymatique. Le détail du calcul de $S_{éq}$ en fonction de S_1 et S_2 est donné en annexe. La grandeur $S_{éq}$ est donc caractéristique à la fois de l'enzyme et de la nature de l'ADN employé. Si deux ADN ont des $S_{éq}$ différents, on peut conclure que celui qui a le $S_{éq}$ le plus faible est le plus sensible à l'action de l'endonucléase.

Dans les expériences qui vont être rapportées, deux ADN marqués différemment sont mélangés et soumis à l'action de l'enzyme (ou incubés ensemble sans enzyme pour les contrôles). Ils sont aussi centrifugés en commun. Ceci dispense de connaître les coefficients de sédimentation réels, et en fait nous avons admis que les valeurs de S_1 et S_2 étaient donnés par la relation $S = 0{,}00662 \frac{\Delta r}{\omega^2 \Delta t}$ (r en cm, ω en t/min et Δt en heures). Cette relation, déterminée par Abelson et Thomas (1966) pour la sédimentation des ADN dénaturés, semble aussi s'appliquer assez bien à nos conditions puisque nous avons déterminé le coefficient de sédimentation du bactériophage λ avec cette équation, et nous avons obtenu un écart de 1 % par rapport à sa valeur réelle.

4-3-3-2 : Conditions expérimentales.

a) : Endonucléase *Eco*K.

Le milieu d'incubation (150 µl) comprend : Tris-HCl 7 x 10^{-2} M, PH 7,8 ; 2-mercaptoéthanol 5 x 10^{-3} M ; EDTA 2 x 10^{-4} $MgCl_2$ 2 x 10^{-3} M ; ADN $Ré_1$, 0,4 µg ; ADN de E. coli 803., 0,45 µg. Les mélanges sont incubés à 37° C sans ou avec Ado-met (5 x 10^{-5} M) pendan 45 minutes. L'enzyme est ajouté par fractions de 5 µl aux temps 0, 10 et 20 minutes de l'incubation.

b) : Endonucléase Eco_{RI}.

Le milieu d'incubation (150 µl) comprend : Tris-HCl 10^{-1} M, PH 8 ; $MgCl_2$ 5 x 10^{-3} M ; 0,21 µg d'ADN de E. coli 803. (4 000 cpm) ; 0,75 µg d'ADN $Ré_1$ (1 900 cpm) ; et 10 µl d'enzyme ou de tampon Tris 10^{-2} M PH 8 + NaCl 0,5 M. Les mélanges sont incubés pendant trois heures à 37° C.

c) : Endonucléase Hin_dII.

Le milieu d'incubation (150 µl) est conforme aux spécifications de SMITH et WILCOX (1970). Les ADN sont présents à raison de 0,21 µg pour l'ADN de E. coli 803. et 0,75 µg pour l'ADN $Ré_1$. Les incubations sans enzyme ou avec 7,2 x 10^{-4} unités d'endonucléase Hin_dI sont faites pendant quatorze heures à 37° C.

d) Centrifugation.

En fin d'incubation, 10 µl d'EDTA 0,5 M PH 8 et 40 µl de NaCl 4 M (2 M pour les incubations avec l'endonucléase *Eco*K) sont ajoutés. Les 200 µl obtenus sont déposés au sommet de gradients linéaires de saccharose de 5 % à 20 % faits dans le tampon Tris-HCl 5 x 10^{-2} M PH 7, + NaCl M + EDTA 10^{-4} M.

Les gradients sont centrifugés dans les conditions appropriées, 32 fractio environs en sont recueillies et comptées en double marquage dans un compte à scintillation Intertechnique SL30.

4-3-3-3 : Résultats.

a) L'ADN $Ré_1$ est non modifié.

L'incubation de l'ADN $Ré_1$ avec l'endonucléase *Eco*K conduit à une dégradation dépendante de la présence de Ado-met dans le milieu. La figure 4 montre le changement de profil de sédimentation de l'ADN. Le coefficient de sédimentation équivalent $S_{éq}$ obtenu est de 30,5. Une expérience similaire, avec 20 µl d'enzyme au lieu de 15, a conduit à un $S_{éq}$ égal à 27,6. Ces résultats montrent que l'ADN $Ré_1$ n'est modifié sur aucun des deux brins. On sait en effet qu'un ADN modifié sur un brin est insensible à la restriction par l'endonucléase *Eco*K (Meselson et Yuan, 1968).

b) Il y a peu ou pas de recouvrement de spécificité entre la méthylation générale de l'ADN de E. coli K_{12} et les systèmes *Eco*K, Eco_{RI} et Hin_dII.

Le tableau I présente les valeurs des coefficients de sédimentation équivalents $S_{éq}$ des ADN non méthylé et non modifié après actio des endonucléases *Eco*K, Eco_{RI} et Hin_dII. Les deux ADN conduisent à des valeurs très voisines pour chaque enzyme. La précision des expériences est limitée par le fait que lorsque le coefficient initial S_1 diminue par rapport à $S_{éq}$, la détermination de ce dernier terme devient rapidement imprécis C'est le cas, en particulier, du $S_{éq}$ calculé pour l'endonucléase K. Si l'on admet que, compte tenu des imprécisions expérimentales, la différence entre les valeurs de $S_{éq}$ est inférieure à 10 %, le calcul montre que la différence entre le nombre de coupures par unité de longueur est inférieure à 30 %. Ceci revient à dire que l'absence de méthylation générale donne naissance à moins de 30 % de nouveaux sites de restriction par rapport à ceux existant en présence de cette méthylation.

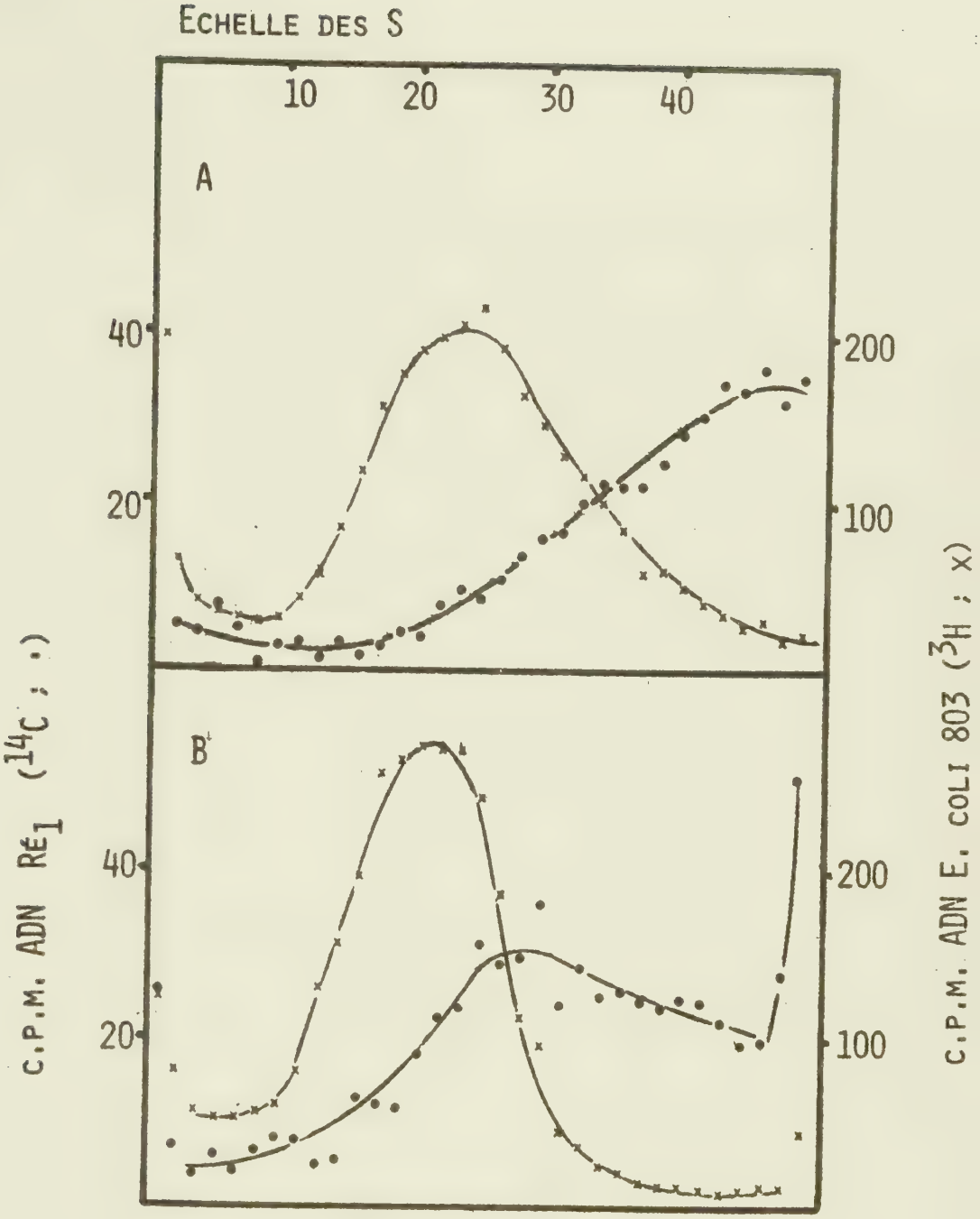


FIGURE 4 : DÉGRADATION DES ADN NON METHYLÉ ET NON MODIFIÉ PAR L'ENDONUCLÉASE Eco K.

A : ADN INCUBÉS SANS ADO-MET
B : ADN INCUBÉS EN PRÉSENCE D'ADO-MET (5×10^{-5} M)

LES GRADIENTS ONT ÉTÉ CENTRIFUGÉS PENDANT DEUX HEURES À 57 000 RPM DANS LE ROTOR SPINCO SW 65.

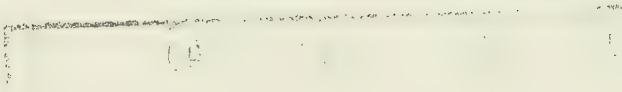


TABLEAU I : MESURE DES COEFFICIENTS DE SEDIMENTATION $S_{éq}$.

ENDONUCLEASE	ADN	S_1	S_2	$S_{éq}$
*Eco*K	E. coli 803	23,3	20,8	31,4
	$Ré_1$	46	28	30,5
Eco_{RI}	E. coli 803	21,5	17	21,3
	$Ré_1$	28,4	20,1	23,2
Hin_dII	E. coli 803	21,5	13,2	14,4
	$Ré_1$	28,4	13,9	14,5

Les coefficients de sédimentation sont exprimés en Svedbergs.

4 - 4 : DISCUSSION.

J'ai montré précédemment (voir section 3) que l'ADN formé lors de la carence en méthionine du mutant dna B de E. coli K CRT 266, après une période de deux heures à 40° C, était fait d'environ 1/3 d'ADN semi méthylé et 2/3 d'ADN non méthylé.

Je décris ici une méthode permettant d'isoler ces ADN avec une masse moléculaire élevée (environ 1,5 x 10^8 Daltons). La méthylation in vitro montre que l'ADN supposé non méthylé isolé par ce moyen, incorpore un taux de groupes méthyls du même ordre de grandeur que celui incorporé in vivo dans les conditions permissives. Il n'est néanmoins pas possible de déterminer un taux de groupes méthyls résiduels éventuel. En effet, d'une part les valeurs données par différents auteurs pour les taux de méthylation in vivo varient considérablement. D'autre part les valeurs obtenues pour la méthylation in vitro, outre leur imprécision, sont obtenues par défaut.

J'ai obtenu, avec l'ADN semi résiduel $Ré_{0,5}$, un taux de méthylation in vitro égal à 28 % de celui de l'ADN $Ré_1$ (non méthylé). Ceci diffère des 50 % attendus. Cette différence peut s'expliquer par le fait que lors de ces expériences, la masse moyenne de l'ADN $Ré_{0,5}$ était très inférieure à celle de l'ADN $Ré_1$. Or, on sait depuis Hurwitz (1964) que les taux de méthylation varient suivant la masse de l'ADN utilisé.

L'action de l'endonucléase *Eco*K sur l'ADN $Ré_1$ montre que celui-ci est sous modifié sur les deux brins. Quelle conclusion peut-on tirer des résultats quantitatifs obtenus ?

1) D'une part, la quantité d'enzyme utilisée dans les expériences de dégradation paraît saturante par rapport à la dégradation observée (je n'ai pu, pour des raisons techniques, en utiliser de plus grandes). En effet, on peut calculer le nombre de coupures que peut faire une quantité d'enzyme donné, d'après les assomptions suivantes

   - Une molécule d'enzyme est nécessaire et suffit pour retenir une molécule d'ADN du bactériophage λ sur un filtre de nitrocellulose en présence d'ATP et de Ado-met ;

- Chaque molécule d'endonucléase *Eco*K fait une coupure et une seule in vitro, dans un temps inférieur à 10 minutes (Meselso et Yuan, 1968 ; Lautenberger et Linn, 1972).
Or la quantité d'enzyme utilisée devait suffir théoriquement à dégra der totalement la quantité d'ADN utilisée à condition que la valeur de son $S_{éq}$ soit supérieure à 18. La valeur $S_{éq}$ obtenue, soit 31, per met donc de penser que l'on a bien affaire à un ADN totalement dégradé. Le fait que le $S_{éq}$ d'un ADN non modifié soit égal (et non inférieur) permet de conclure que l'ADN $Ré_1$ est, sinon totalement non modifié, du moins presque totalement non modifié. Enfin, il faut noter que un $S_{éq}$ égal à 31 correspond à la non-modification d'une base sur 70 000, ce qui est extrêmement faible.

2) Cependant, deux faits peuvent jouer qui rendent moins certaine la conclusion précédente.

- L'efficacité de l'endonucléase dépend de la concentration d'ADN utilisée (Lautenberger et Linn, 1972). Ceci peut affecter l'hypothèse relative à la saturation de l'ADN par l'enzyme et la conclusion qui en découle.

- L'endonucléase *Eco*K est associée à une méthylation *Eco*K qui modifie l'ADN dans les conditions de la restriction in vitro (Meselson et coll., 1972). Cette propriété -qui peut expliquer la forte dissymétrie du pic obtenu après action de l'endonucléase (figure 4)- introduit une surestimation de la valeur de $S_{éq}$, toutes choses égales par ailleurs.

Au stade actuel de l'expérimentation, on peut donc dire en résumé que l'ADN $Ré_1$ est soit non-méthylé et non-modifié, soit un peu méthylé et un peu modifié. Il n'est pas possible, compte tenu des variables en jeu, de quantifier une limite supérieure au pourcentage de méthylation et de modification résiduelles de cet ADN.

La mesure de dégradabilité de l'ADN non-méthylé, comparée à celle d'un ADN non modifié, permet de conclure que leur différence de susceptibilité aux endonucléases *Eco*K, *Eco*$_{RI}$ et *Hin*$_{d}$II est inférieure à 30 %. En ce qui concerne les deux derniers enzymes, ce résultat ne contredit aucun fait apparent.

Par contre le résultat obtenu avec l'endonucléase *Eco*K suggère que l'adénine méthylase n'est nullement nécessaire pour empêcher l'autorestriction de l'ADN de E. coli, puisque sa présence ne diminue pas le nombre de sites de restriction (dans une grande proportion). Ceci est apparemment contradictoire avec le fait que les mutants de l'adénine méthylase, malgré une activité de restriction K réduite, deviennent autorestricteurs (Marinus et Morris, 1973).

Toutefois, j'ai supposé jusqu'ici que l'interférence entre la méthylation générale et les systèmes de modification-restriction découlait d'effets indépendants sur les séquence de l'ADN. On peut aussi supposer que l'interférence si elle existe est le produit d'une quelconque interaction des enzymes, influant sur leur spécificité. Par exemple -mais ce n'est ici qu'un modèle parmi d'autres possibles- on peut supposer qu'une mutation de l'adénine méthylase change la grille de spécificité de l'endonucléase *EcoK* in vivo. Une hypothèse de ce type aurait le mérite de concilier les observations faites avec les mutants de l'adénine méthylase et celles faites in vitro. Enfin, on peut penser que l'action de l'endonucléase *Eco*K purifiée ne reflète pas exactement sa spécificité in vivo.

ANNEXE I CALCUL DU COEFFICIENT DE SEDIMENTATION EQUIVALENT S_{eq}

Soit un ADN de longueur infinie subissant N coupures aléatoires par unité de masse. Sa masse moyenne sera $\overline{M} = \frac{1}{N}$ et la distribution en fréquence des fragments sera:

$$\phi = \phi_o \, e^{-\alpha M} \quad (1)$$

Les coefficients ϕ_o et α peuvent être calculés à partir du fait que la fréquence totale vaut 1, et du fait que la fréquence moyenne est celle de $\overline{M}$.

$$\int_0^{\overline{M}} \phi_{(M)} \, dM = \int_{\overline{M}}^{\infty} \phi_{(M)} \, dM \qquad \text{et} \qquad \int_0^{\infty} \phi_{(M)} \, dM = 1$$

d'où l'on tire : $\phi_o = \frac{1}{\alpha} = \frac{1}{N \ln 2}$

et par substitution dans (1) : $\phi = \frac{2}{N \ln 2} e^{-NM} \quad (2)$

Soient s et ρ le coefficient de sédimentation et la radioactivité, ils sont reliés à M et à ϕ par les relations :

$M = ks^{2,9}$ (Studier, 1965) et $\phi = \frac{K\rho}{M}$ où k et K sont des constantes.

Par substitution dans (2) on obtient : $\rho = \frac{2k \, s^{2,9}}{KN \ln 2} \, e^{-kNs^{2,9}} \quad (3)$

En dérivant l'équation (3) par rapport à s, on obtient une expression $\rho'_{(s)}$ qui s'annule pour s = S, valeur du coefficient de sédimentation au pic. La relation obtenue est : $S^{2,9} = \frac{1}{k \, N} \quad (4)$

Le coefficient de sédimentation équivalent S_{eq} sera celui d'un ADN qui n'aurait subi que N_2 coupures (endonucléolytiques), alors que l'ADN réel a subi d'abord N_1 coupures mécaniques puis N_2. Si on appele S_1 et S_2 les coefficients de sédimentation avant et après action de l'enzyme, la relation (4) donne :

$N_1 = \frac{1}{k \, S_1^{2,9}}$; $N_1 + N_2 = \frac{1}{k \, S_2^{2,9}}$ et $N_2 = \frac{1}{k \, S_{eq}^{2,9}}$, d'où

$$S_{eq} = \frac{S_1 \, S_2}{(S_1^{2,9} - S_2^{2,9})^{1/2,9}}$$

ABELSON, J., et THOMAS, C.A., (1966)
J. Mol. Biol., 18, 262.

BERNARDI, G., (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 423.

BOUCHE, J.P., (1973)
J. Bacteriol., 115, 752-761.

BOUCHE, J.P., et DUBERT, J.M., (1972)
Eur. J. Biochem., 27, 53.

BOYER, H.W., CHOW, L.T., DUGAICZYK, A., HEDGPETH, J. et GOODMAN, H.M., (1973),
Nature, 244, 40.

BOYER, H., SCIBIENSKI, E., SLOCUM, H., et ROULLAND-DUSSOIX, D., (1971)
Virology, 46, 703.

GOLD, M., et HURWITZ, J., (1964)
J. Biol. Chem., 239, 3866.

HATTMAN, S., SCHLAGMAN, S., et COUSENS, L., (1973)
J. Bacteriol., sous presse.

HEHLMANN, R., et HATTMAN, S., (1972)
J. Mol. Biol., 67, 351.

HIROTA, Y., RYTER, A., et JACOB, F., (1968) Cold Spring Harbor
Symp. Quant. Biol., 33, 677-693.

LAUTENBERGER, J.A., et LINN, S., (1972)
J. Biol. Chem., 247, 6183.

MARINUS, M.G., et MORRIS, N.R., (1973)
J. Bacteriol., 114, 1143.

MESELSON, M., YUAN, R., et HEYWOOD, J., (1972)
Ann. Rev. Biochem., 41, 447.

OKADA, T., YANAGISAWA, K., et RYAN, F.J., RYAN, (1961),
Z. Vererbungs, 92, 403.

SMITH, J.D., ARBER, W., et KÜEHNLEIN, U., (1972),
J. Mol. Biol., 63, 9.

SMITH, H.O., et WILCOX, K.W., (1970)
J. Mol. Biol., 51, 379.

STUDIER, (1965), *J. Mol. Biol.*, 11, 373.

SZIBALSKI, W., (1969) in *"Methods in enzymology"* Vol. XII B, p. 330 L. Grossman et K. Moldave éditeurs, Academi press, New-York.

VANYUSHIN, B.F., BELOZERSKY, A.N., KOKURINA, N.A., et KADIROVA, D.X., (1968) *Nature*, 218, 1066.

WOOD, W.B., (1965) *J. Bacteriol.*, 91, 1029.

YUAN, R., et MESELSON, M., (1968) *Nature*, 217, 1110.

YUAN, R. et MESELSON, M., (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 65, 357.

R E S U M E

Cette thèse présente un travail consacré à l'étude de la méthylation de l'ADN de Escherichia coli K 12.

Cette lignée d'E. coli possède deux ADN méthyltransférases distinctes des enzymes de modification,qui n'avaient pu être séparées l'une de l'autre lors de leur purification. L'une méthyle des adénines, l'autre méthyle des cytosines. Nous avons mis au point une nouvelle méthode de purification qui permet de purifier environ 1 500 fois la somme des deux enzymes avec un rendement d'environ 20 %. La préparation ainsi obtenue a moins de 5 % de pureté. De ces paramètres, on peut déduire que la cellule possède moins de cinquante molécules de méthylase. Lors de la purification, l'activité cytosine méthylase est perdue préférentiellement à l'activité adénine méthylase, et dans certains cas nous avons pu réaliser la séparation des deux enzymes.

Les deux enzymes ont des optimums de PH très voisins, et de l'étud de leur sensibilité au PH, on peut tenter de déduire que des résidus histidyls et arginyls sont mis en jeu dans le site actif. Les Km des enzymes pour la S-adénosylméthionine ont été mesurés ; ils sont voisins de ceux des enzymes de modification de E. coli connus, et diffèrent entre eux par un facteur deux.

L'effet inhibiteur de différents analogues de la S-adénosylméthionine a été déterminé. Les deux enzymes sont également sensibles à l'inhibition par la S-adénosyléthionine, analogue du substrat. Par contre, la cytosine méthylase est dix-huit fois plus sensible à l'inhibition par le produit, la S-adénosylhomocystéine, que l'adénine méthylase. Une différence dans le même sens existe pour les dérivés butyls et isobutyls.

L'effet du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, dont on connaissait déjà les propriétés inhibitrices sur l'ADN méthylase du bactériophage T2, a été examiné pour les méthylases purifiées de E. coli K 12. Dans ce cas aussi, il inhibe l'activité méthylasique des

enzymes purifiés, quoique une activation de la cytosine méthylase ait été aussi observée pour de faibles concentrations de LPS. Comme pour la méthylase de T2, les fractions peu purifiées ne sont pas inhibées. L'effet anti-inhibiteur provient vraisemblablement des protéines basiques de ces fractions. La connaissance du rôle antiinhibiteur du LPS nous a permis d'interpréter l'origine de l'absence de méthylation de certains ADN hétérologues. Ces préparations contiennent des traces d'inhibiteur identifiables au LPS par plusieurs critères.

L'étude de la thermoinactivation des enzymes purifiés révèle des différences considérables entre les deux enzymes. En particulier, la stabilité thermique de l'adénine méthylase est très sensible aux variations de force ionique alors que celle de la cytosine méthylase ne l'est pas. La mesure des énergies d'activation de dénaturation permet de mettre en évidence une prépondérance des interactions hydrophobes pour l'adénine méthylase.

Les préparations enzymatiques les plus purifiées donnent un profi de sédimentation unique en gradient de saccharose. Par contre les extraits bruts et fractions semi-purifiées ne donnent le même profil qu'à l'état dilué . Concentrés, ils donnent un profil caractérisé par des coefficients de sédimentation plus élevés. Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'u ligand non dialysable et plus thermostable que les méthylases, capable de s'associer à l'enzyme purifié et de lui conférer le profil de sédimentation caractéristique des fractions moins purifiées concentrées. La fonction de c ligand reste inconnue.

Dans une seconde partie de ce travail, nous avons cherché à vérifier l'hypothèse de C. Lark sur le rôle de la méthylation dans la réplication de l'ADN. L'idée de départ était que, si l'absence de méthylation est la cause de l'arrêt de synthèse observé dans les expériences de C. Lark l'addition de S-adénosylméthionine à des bactéries toluénisées après l'arrê de la synthèse en l'absence de méthionine, devait rendre ces bactéries à nouveau capables de synthétiser de l'ADN dans un système semi-in vitro.

La recherche d'un système dans lequel l'écart entre les synthèses avec et sans méthionine serait maximal nous a conduit à employer une souche dna B thermosensible de E. coli K 12 (souche CRT 266).

Nous avons d'abord estimé, par une méthode cinétique, la durée de la phase de synthèse des protéines initiatrices du cycle surnuméraire obtenu après un passage à 40° C. Le temps trouvé, soit 17 minutes, est en bon accord avec les temps mesurés par d'autres auteurs.

Nous avons ensuite recherché les conditions pour lesquelles le taux de synthèse résiduelle après un passage à 40° C est maximal. En milieu glucose, nous pouvons faire varier deux facteurs : le temps de passage à 40° C et le temps de synthèse après retour à 30° C. Les valeurs optimales pour ces deux facteurs sont respectivement 2 et environ 24 heures. Dans ces conditions, la synthèse résiduelle sans méthionine s'est révélée supérieure à un doublement, contrairement à ce que prévoit l'hypothèse de C. Lark. Elle reste néanmoins inférieure à celle obtenue en l'absence de thréonine ou de leucine, ou à celle obtenue en présence de chloramphénicol.

Une analyse plus détaillée a permis de montrer que l'écart entre les synthèses avec et sans méthionine provient de la suppression de la vague de réinitiations synchrones qui suit le retour à 30° C, tandis que la synthèse à bas flux d'initiations qui dure de nombreuses heures n'est pas affectée.

Cet effet de l'absence de méthionine est similaire à celui des inhibiteurs de l'ARN polymérase sur la synthèse résiduelle d'ADN des bactéries Thy$^-$ après carence en thymidine (K.G. Lark, 1972). C'est pourquoi nous postulons un rôle de la méthionine en connexion avec la synthèse de l'ARN d'initiation.

En jouant sur un troisième facteur, le temps de doublement des bactéries, nous avons pu accroître la synthèse résiduelle jusqu'à + 1 000 % avec méthionine, et + 500 % sans méthionine. L'ADN formé dans ces dernières conditions est composé d'une partie semi-méthylée et d'une partie non mé-

thylée, comme le montrent des expériences de marquage de densité combiné à un double marquage à la thymine ^{14}C et à la méthionine ^{3}H.

Après un simple marquage à la thymine ^{14}C et un marquage de densité de l'ADN non résiduel, il est possible d'isoler deux ADN de haute masse moléculaire, séparés d'après leur densité.

Nous avons montré que ces deux ADN sont méthylables *in vitro* par les méthylases de *E. coli* K 12, à des taux voisins de ceux auxquels doivent l'être des ADN semi-méthylés et non-méthylés, respectivement.

L'ADN supposé non méthylé est sensible à l'endonucléase de restriction K purifiée, ce qui indique qu'il n'est modifié sur aucun des deux brins. Nous avons comparé cet ADN à un ADN non modifié mais méthylé normalement pour le reste, pour leur sensibilité aux enzymes de restriction R.K, $R.R_1$ et de *Haemophilus influenzae*. Les deux types d'ADN sont également sensibles à ces endonucléases.

Nous concluons que l'absence de la méthylation générale ne démasque pas de sites supplémentaires pour la restriction par ces enzymes ou, en d'autres termes, qu'il n'y a pas d'interférence entre la méthylation générale de l'ADN de *E. coli* K 12 et les systèmes de modification-restriction K, R_1 et *H. influenzae* Rd.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le service de Biologie Cellulaire de l' Institut Pasteur puis dans l'unité d' Immunodifférenciation de l' Institut de Biologie Moléculaire à la faculté des Sciences. Le fait d'avoir mené ce travail dans un laboratoire essentiellement consacré aux problèmes immunologiques aurait pu constituer un certain handicap. S'il n'en a pas été ainsi, je le dois en premier lieu à Jean-Marie DUBERT qui a voulu et su garder un intérêt constant, amical et compétent, pour ce travail, malgré les lourdes et multiples tâches qu'il assume. C'est, l'avouerais-je, à sa remarquable disponibilité intellectuelle que je dois de n'avoir pas plus souvent cédé à un pessimisme parfois décourageant, même pour les autres. Pour tout celà, je le remercie.

Nombreux sont ceux et celles qui, à l'Institut Pasteur comme à l'Institut de Biologie Moléculaire, m'ont aidé à un moment ou à un autre par leurs conseils, leurs suggestions, leurs critiques et... leur temps. Je ne saurai hélas les citer tous. Je remercie en particulier:

M. Michel GOLDBERG, pour ses critiques sur la partie enzymologique de ce travail, en particulier celle relative à la sédimentation des enzymes, et pour avoir accepté de présider mon jury.

M. Gérard BUTTIN, pour les conseils et discussions fructueuses relatives à la deuxième partie de ce travail, et pour avoir accepté d'en être le rapporteur.

M^{elle} Jeannine YON, pour les discussions relatives en particulier à l'interprétation de la thermoinactivation des enzymes.

Je tiens enfin à remercier M^{elle} Brigitte HERMIER qui, à de nombreuses reprises et de manière continue pour la dernière partie, a apporté une contribution technique compétente et efficace à ce travail.